



Universidade de Aveiro Departamento de Biologia
2008

**Ana Patrícia
Domingues Cuco**

Validação de um ensaio *in situ* com *Eisenia andrei*



**Ana Patrícia
Domingues Cuco**

Validação de um ensaio *in situ* com *Eisenia andrei*

dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Toxicologia e Ecotoxicologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Ruth Maria de Oliveira Pereira, Investigadora do Centro de Estudos do Ambiente e do Mar (CESAM), Universidade de Aveiro, e co-orientação científica da Doutora Sara Cristina Ferreira Marques Antunes, Estagiária de Pós-Doutoramento no Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

...à minha família, pelo esforço e dedicação...

o júri

presidente

Doutor António José Arsénia Nogueira

professor associado com agregação, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutor Fernando José Mendes Gonçalves

professor auxiliar com agregação, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutor Bruno André Fernandes de Jesus da Silva Nunes

professor auxiliar da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Fernando Pessoa

Doutora Ruth Maria de Oliveira Pereira

Investigadora auxiliar, CESAM . Centro de Estudos do Ambiente e do Mar, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

Doutora Sara Cristina Ferreira Marques Antunes

Investigadora de pós-doutoramento, Departamento de Biologia da Universidade de Aveiro

agradecimentos

A realização deste trabalho só foi possível devido à contribuição de muitas pessoas que, por apoio científico ou psicológico, permitiram que num ano extremamente rápido as coisas não se ficassem pelo caminho. Assim, utilizo estas palavras para agradecer e dar a conhecer a várias pessoas o que elas significam para mim. Ainda que não o diga pessoalmente, certamente não quer dizer que não o sinta.

Em primeiro lugar, ao Professor Doutor Fernando José Mendes Gonçalves por me ter aceite na sua equipa e me ter proporcionado todas as condições necessárias à prossecução da presente dissertação.

Às orientadoras desta tese, que me deram o “bichinho” do mestrado, já que não fazia parte dos meus planos. Pelo seu trabalho, apoio, boa disposição e companheirismo, o meu muito obrigado à Professora Ruth e à Sara. Sem desfazer na Professora Ruth, sempre muito ocupada, um agradecimento especial à Sara, pela sua paciência em me aturar o tempo todo.

Aos colegas de laboratório, onde caí de pára-quedas mas onde me senti sempre bem, num ambiente tão tranquilo como já não se vê em muitos sítios. Obrigado por todos os que se dispuseram a ajudar-me ao longo do ano.

Ao meu grupo fantástico de amigos, de quem não me posso queixar. Especialmente à Ana Sofia, à Carina, à Sandra, à Sara, à Susy e à minha Prima Teresa pela amizade espectacular que criámos em todos estes anos e pelas conversas doidas e relaxantes na esplanada do café... Stella, longe da vista, mas perto do coração... Sem enumerar, todos os outros meus amigos merecem o meu apreço. À pequena Beatriz que me proporcionou vários momentos de descontração. E à Laura, que já está a caminho.

À minha família toda... primos, primas, avós, tios, padrinhos... São tantos que não posso enumerar todos. Obrigado pelo vosso apoio.

Ao meu mano Pedro, pela proximidade e à vontade, que acho que só a nossa pequena diferença de idade nos poderia dar.

À minha mana Sara, pelos desatinos e doideiras... Sara, relax... Não sou sempre má.

Aos meus pais, pelo seu esforço e dedicação, contínuo apoio e vontade de me ver vencer na vida. Devo a vocês tudo o que consegui atingir.

Obrigada a todos...

palavras-chave

Ensaio *in situ*; *Eisenia andrei*; biomarcadores de *stress oxidativo*; factores de bioconcentração (FBC); metais

Resumo

Os ensaios biológicos referentes ao compartimento terrestre são ainda escassos, sobretudo no que refere a ensaios *in situ*, fundamentais para a análise de risco de locais contaminados. Este trabalho teve assim como objectivo validar um ensaio desenvolvido por Antunes et al. (*in press*) com *Eisenia andrei*, de forma a definir o tempo de exposição mínimo necessário para observar efeitos significativos em termos de bioacumulação de metais e em parâmetros moleculares de stress oxidativo. O ensaio foi desenvolvido segundo os procedimentos do ensaio inicial, mas com tempos de exposição (2, 4, 7 e 14 dias). iguais e superiores ao previamente definido. Após os diferentes períodos de exposição, foram avaliados biomarcadores de stress oxidativo (TBARS – substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico; actividade da enzima catalase e actividade das enzimas glutathione-S-transferases) e a bioacumulação de metais nos organismos, com o subsequente cálculo dos factores de bioconcentração (FBC) Os resultados foram então sujeitos a tratamento estatístico, que demonstrou que os organismos apresentam bioacumulação significativa que depende do solo e do tempo de exposição (excepto Mn e Pb) A avaliação dos biomarcadores voltou a não ser um parâmetro muito sensível à contaminação ambiental, uma vez que apenas dois dos três biomarcadores analisados revelaram respostas sensíveis, e mesmo assim, apenas para exposição a alguns dos solos utilizados. De acordo com os resultados obtidos é possível concluir que 14 dias são o tempo de exposição mínimo necessário para registar alterações significativas nos parâmetros avaliados.

Keywords

In situ bioassays; *Eisenia andrei*; oxidative stress biomarkers; bioconcentration factors (BCFs); metals

Abstract

Although their crucial importance for the ecological risk assessment of contaminated sites, bioassays for the terrestrial compartment, mainly *in situ* bioassays, are still scarce. Hence, the goal of this study was to validate an *in situ* bioassay previously developed by Antunes et al. (*in press*) with *Eisenia andrei*, to define the minimal exposure time needed to record significant effects in terms of metals bioaccumulation and oxidative stress biomarkers. The assay followed the methodology previously defined, but increasing the 2 day's exposure period for 4, 7 e 14 days. At the end of each exposure period oxidative stress biomarkers (TBARS - thiobarbituric acid reactive substances), catalase activity and glutathione S-transferases activity were analysed, as well as, metals residues bioaccumulated in the whole body of the organisms. This last data was used to calculate bioconcentration factors (BCF). Data was submitted to statistical analysis, wich demonstrated that organisms presented soil and time-dependent significant bioaccumulation (except for Mn e Pb). Biomarkers analysis were not sensitive parameters to environmental pollution once again, since only two of the three analysed biomarkers revealed significant responses, only in organisms exposed to some of the test soils. According to the results obtained it was possible to conclude that 14 days is the minimal exposure time needed to record significant changes in the analysed parameters.

Índice

Índice	I
Índice de Figuras	II
Índice de Tabelas	II
1. Introdução	1
1.1 <i>Objectivos do trabalho</i>	6
2. Material e Métodos	8
2.1 <i>Área de estudo</i>	8
2.2 <i>Ensaio in situ com Eisenia andrei</i>	9
2.3 <i>Caracterização físico-química dos solos</i>	11
2.4 <i>Conteúdo de metais em Eisenia andrei</i>	12
2.5 <i>Biomarcadores de stress oxidativo</i>	13
2.6 <i>Análise estatística</i>	14
3. Resultados	15
3.1 <i>Caracterização físico-química dos solos</i>	15
3.2 <i>Conteúdo de metais em Eisenia andrei</i>	18
3.3 <i>Factores de bioconcentração (FBCs) em Eisenia andrei</i>	21
3.4 <i>Biomarcadores de stress oxidativo</i>	24
4. Discussão	28
4.1 <i>Ensaio in situ e caracterização físico-química dos solos</i>	28
4.2 <i>Bioacumulação de metais</i>	30
4.3 <i>Biomarcadores de stress oxidativo</i>	34
5. Conclusão	37
6. Bibliografia	39

Índice de Tabelas

Tabela 1 – Valores médios e respectivos erros padrão dos parâmetros físico-químicos gerais registados nas amostras de solo naturais (A, B e I) e no solo referência (Lufa 2.2). Os dados referentes ao solo Lufa 2.2 apresentam-se em intervalos de valores medidos. Negrito – valores mais elevados	16
Tabela 2 – Conteúdo de metais ($\mu\text{g g}^{-1}$) (média±erro padrão) nos diferentes solos naturais após exposição <i>in situ</i> . Análise dos solos: Lufa 2.2 ao fim de 2 dias e ao fim de 14 dias no caso dos solos naturais. Negrito - valores mais elevados	17
Tabela 3 – Valores obtidos nas ANOVAs unifactoriais para os parâmetros físico-químicos e para o conteúdo em metais dos solos (A, B e I), ao fim de 14 dias de exposição. Negrito – F= valores mais elevados; $p \leq 0,005$	18
Tabela 4 – Factores de bioconcentração (FBCs) para <i>Eisenia andrei</i> calculados para os diferentes períodos de exposição <i>in situ</i> a cada solo natural e ao solo Lufa 2.2. Resumo das Anova bifactoriais para os FBCs para as variáveis solo e tempo de exposição (TE).	22
Tabela 5 – Resumo das ANOVAs unifactoriais realizadas para comparar os valores de FBCs para cada metal, entre os quatro períodos de exposição. Análise realizada para cada solo (A, B e I) de forma independente.	23

Índice de Figuras

Figura 1 – Representação esquemática da área escolhida para o desenvolvimento do ensaio <i>in situ</i> . Os Locais A e B localizam-se junto à entrada da exploração subterrânea da mina e o Local I encontra-se a montante (potencial local de referência). (<i>adaptado de</i> Pereira et al., 2008)	9
Figura 2 – Início do ensaio <i>in situ</i> com a introdução dos organismos em estudo (<i>E. andrei</i>) nas câmaras-teste (à esquerda) e posterior colocação das câmaras em depressões feitas no terreno (à direita).	10
Figura 3 – Câmaras-teste já dispostas para início do ensaio <i>in situ</i> , enterradas até à tampa no solo local (à esquerda) e protecção do ensaio com um saco plástico de modo a evitar a acção directa da chuva e sol (à direita).	10
Figura 4 – Variação do conteúdo em metais nos organismos (<i>E. andrei</i>) expostos <i>in situ</i> , para cada local e durante os períodos de exposição definidos. As barras de erro correspondem ao erro padrão.	20
Figura 5 – Variação dos valores de TBARS determinados em <i>E.andrei</i> exposta <i>in situ</i> aos solos A, B e I, para os diferentes períodos de exposição (*significativamente diferente do solo Lufa 2.2, com $p<0,05$).	25
Figura 6 – Variação da actividade da enzima catalase (média ± erro padrão) determinada em <i>E.andrei</i> exposta <i>in situ</i> aos solos A, B e I, para os diferentes períodos de exposição.	26
Figura 7 – Variação da actividade da enzima Glutathione S-transferase (média ± erro padrão) determinada em <i>E.andrei</i> exposta <i>in situ</i> aos solos A, B e I, para os diferentes períodos de exposição. (*significativamente diferente do solo Lufa 2.2, com $p<0,05$).	27

1. Introdução

A opinião pública considera os compartimentos aquático e aéreo mais importantes, do que o compartimento terrestre porque são usados para suprir necessidades básicas, como o fornecimento de ar para respirar e de água para consumir (Beck et al., 2005). O solo, por outro lado, aparece apenas como um substrato para a produção de alimento (Beck et al., 2005), pelo que não lhe é dada particular atenção. No entanto, o solo é muito importante para a sobrevivência de uma vasta maioria das espécies existentes na superfície terrestre, para o fornecimento de alimento, protecção dos recursos hídricos, e manutenção da qualidade local e global do ambiente (O'Halloran, 2006). O solo tem ainda a capacidade de reter e concentrar substâncias químicas, o que o torna altamente vulnerável à sua presença. Esta acumulação pode ser bastante mais significativa neste compartimento do que em qualquer outro compartimento ambiental (O'Halloran, 2006), daí que a avaliação da sua qualidade e da sua capacidade de executar funções ecológicas fundamentais tenha vindo a receber uma maior atenção nos últimos anos.

No âmbito da análise de risco de locais contaminados, alguns modelos conceptuais têm sido propostos, consistindo normalmente numa avaliação por etapas. Esta avaliação incorpora componentes tanto de observação (e.g. monitorização de comunidades locais) como de investigação (e.g. determinações toxicológicas de relações causa-efeito para stressores químicos ou físicos) (Jensen et al. 2006; Semenzin et al., 2008). A análise de risco ecológica (ARE) tem vindo, cada vez mais, a ser aconselhada, como suporte ao processo de tomada de decisão para o controlo de locais contaminados (Weeks e Comber, 2005) na medida em que pode ser usada para avaliar problemas ambientais resultantes de actividades passadas (e.g. explorações mineiras desactivadas), presentes (e.g. campos agrícolas) e, em alguns casos, associados a actividades futuras (Weeks e Comber, 2005).

A análise de risco ecológico integra simultaneamente informação sobre a exposição e informação sobre os efeitos dessa exposição em relação a um local específico (Weeks e Comber, 2005). Assim, segundo um dos métodos propostos (TRIÀDE), a análise do local contaminado reúne informação de três linhas de evidência (LE) para uma avaliação correcta dos efeitos da contaminação. A primeira LE (química) é baseada na caracterização física e química das matrizes ambientais e subsequente comparação das concentrações de contaminantes presentes com dados de toxicidade já descritos, ou com valores de rastreio

descritos para o compartimento em causa. A segunda LE (ecotoxicológica) baseia-se na avaliação da toxicidade das matrizes contaminadas, em laboratório, utilizando espécies padronizadas ou, sempre que possível, espécies autóctones que sejam representativas dos organismos sujeitos à contaminação ambiental. E finalmente, a terceira linha de evidência (ecológica) baseia-se na caracterização da comunidade indígena (van Straalen, 2002; Semenzin et al., 2008), por comparação de parâmetros populacionais registados no passado, ou num local de referência seleccionado.

A informação obtida pelas três LEs (i.e. química, ecotoxicológica e ecológica) é única e complementar. A combinação dos vários componentes é necessária, uma vez que nenhum deles, em particular, consegue fornecer informação compreensiva (Semenzin et al., 2008) que permita uma avaliação dos efeitos sobre os ecossistemas contaminados com reduzido grau de incerteza. A LE química deve fornecer informação não apenas sobre a contaminação total, mas também sobre a contaminação biodisponível; a ecotoxicologia fornece evidências directas de toxicidade de solos relacionadas com a contaminação, mas os testes efectuados são dirigidos frequentemente em condições laboratoriais e podem não ser directamente aplicáveis a condições *in situ*; e finalmente a ecologia fornece normalmente evidências directas de efeitos relacionados com os contaminantes no ambiente, integrando as suas interacções com toda a panóplia de variáveis ambientais, que governam a sua biodisponibilidade e a sua capacidade de produzir efeitos tóxicos, assim como os seus efeitos combinados (sinérgicos, aditivos, etc.) (Hankard et al., 2005). Estas vantagens são igualmente atribuídas aos ensaios ecotoxicológicos *in situ*, em detrimento dos ensaios laboratoriais (Bundy et al., 2007; Castro et al., 2003; Pereira et al., 2000).

A análise química isoladamente não permite uma integração dos efeitos produzidos pela mistura química presente (Gupta et al., 1996) num local contaminado. Além disso, as concentrações totais podem sobrestimar o risco real, já que factores ambientais, de variabilidade sazonal podem reduzir fortemente a biodisponibilidade e, consequentemente, a toxicidade dos poluentes (Fernández et al., 2005). Assim, a análise biológica/ecotoxicológica oferece inúmeras vantagens para reduzir a incerteza da análise química (Weeks e Comber, 2005; Hankard et al., 2005).

Os ensaios ecotoxicológicos, com soluções de substâncias químicas individuais, desempenham um papel chave, pelo facto de serem padronizados e conduzidos em ambiente e condições controladas (Castro et al., 2003; van Straalen, 2002) o que permite a

reprodutibilidade dos resultados obtidos. No entanto, esta análise laboratorial não fornece obrigatoriamente informação ecologicamente relevante para a área em questão, principalmente porque as situações em campo não podem ser rigorosamente simuladas em laboratório (Castro et al., 2003), o que leva a que eles não reflectam a variabilidade na exposição que ocorre em condições naturais o que levanta a incerteza na extrapolação dos resultados laboratoriais para as condições naturais na avaliação dos riscos (Martín-Díaz et al., 2004).

Um método de avaliar a toxicidade de contaminantes ambientais, aumentando a relevância ecológica, consiste em medir directamente os efeitos produzidos, expondo os organismos no laboratório a matrizes (água ou solo) recolhidas no local contaminado (*ex situ*), ou expondo-os directamente no local (*in situ*) (Weeks e Comber, 2005; O'Halloran, 2006

). No caso do solo, a toxicidade pode também ser avaliada pela exposição dos organismos teste à água intersticial ou a lixiviados/elutriados preparados a partir de amostras colhidas no local (O'Halloran, 2006).

Os ensaios toxicológicos *in situ* são ferramentas úteis em ecotoxicologia, já que são conduzidos no local contaminado, em vez de obedecerem às condições impostas em laboratório, o que permite obter dados ecologicamente relevantes. Impedem também alterações na toxicidade da amostra resultantes da sua colheita, manuseamento e armazenamento (Castro et al., 2003; Castro et al., 2004). Para além disso, o facto de ser *in situ* permite uma exposição mais realista, uma vez que também as condições físico-químicas são as naturais (Castro et al., 2003).

Recentemente, têm sido desenvolvidos, com sucesso, ensaios *in situ* com cladóceros, anfípodes, quironomídeos, oligoquetas e bivalves (Pereira et al., 2000; Castro et al., 2003; Bolognesi et al., 2004; Burton Jr et al., 2005). Muitos destes ensaios usam uma única espécie como organismo-teste e a maioria usa respostas sub-letais (sobrevivência, crescimento e desenvolvimento) como parâmetros a avaliar. Estas respostas são ecologicamente relevantes porque, embora sendo respostas individuais, são indicadoras da saúde, estrutura e dinâmica das populações (Faria et al., 2006). Os ensaios *in situ* desenvolvidos nos últimos anos, destinaram-se predominantemente ao compartimento aquático (e.g., Pereira et al., 2000; Castro et al., 2003, 2004; Burton Jr et al., 2005; Faria et al., 2006; Moreira et al., 2006;). Em relação ao compartimento terrestre, os exemplos são

bem mais escassos (e.g., Callahan et al., 1991; Hankard et al., 2004; Antunes et al., 2008), demonstrando a necessidade de conceptualizar e desenvolver metodologias para este compartimento.

Nos ensaios desenvolvidos *in situ*, a análise biológica pode ser feita a variados níveis de organização biológica (Fent, 2004; Weeks e Comber, 2005), desde o nível sub-celular, a efeitos a nível da população, comunidade ou ecossistema (Weeks e Comber, 2005; Winston et al., 2002). Ao nível sub-celular, surgem os biomarcadores moleculares, que não devem ser aplicados isoladamente mas integrados em programas de investigação ecotoxicológica que devem incluir simultaneamente a análise dos resíduos de contaminantes em tecidos/órgãos alvo e estudos fisiológicos que reflectam a condição animal (Doyotte et al., 1997).

Os biomarcadores definem-se como sendo respostas biológicas específicas relacionadas com o metabolismo, a desintoxicação e/ou toxicidade induzida por contaminantes (Martín-Díaz et al., 2004). Na avaliação do impacto de contaminantes sobre os ecossistemas os biomarcadores apresentam diversas vantagens, nomeadamente: a capacidade de detectar precocemente ocorrências resultantes de várias condições de *stress* nos organismos expostos, antecipando mudanças a níveis mais elevados da organização biológica (i.e., indivíduo, população, comunidade ou ecossistema) e de monitorizar progressões ou regressões temporais dos distúrbios em vários níveis de organização biológica (Martín-Díaz et al., 2004). Deste modo, esta informação pode ser usada de uma maneira preventiva, como um primeiro alarme, permitindo a iniciação de estratégias de bioremediação antes da ocorrência de danos ambientais irreversíveis com consequências ecológicas graves (Martín-Díaz et al., 2004). Os biomarcadores podem assim ser classificados como bioindicadores a curto-termo de efeitos biológicos de longo-termo (Martín-Díaz et al., 2004).

A aplicação de biomarcadores em organismos expostos em ensaios *in situ* tem sido proposto por muitos autores como uma ferramenta de diagnóstico importante, para avaliar os efeitos sub-letais em organismos expostos a condições ambientais reais (De Coen et al., 2006, Adams et al, 2001, Alla et al, 2006). No entanto, o uso de biomarcadores em trabalhos de campo apresenta algumas desvantagens, como o risco inerente do ensaio ser destruído por animais ou vandalizado por humanos que passem no local. Em ensaios de campo, variações substanciais de parâmetros sub-letais podem ocorrer uma vez que são

numerosos os factores (e.g. matéria orgânica, humidade, pH) que podem mudar drasticamente o intervalo normal em que o biomarcador deveria responder. Por outro lado, os próprios factores físicos e químicos podem funcionar como factores de confusão na medida em que podem eles próprios induzir alterações a nível molecular (Vidal et al., 2002). Contudo, estas aparentes desvantagens, ainda que dificultem a interpretação das respostas, e o estabelecimento de relações causa-efeito, não comprometem de forma nenhuma a relevância ecológica dos ensaios *in situ*.

Ao longo da história evolutiva, os organismos desenvolveram mecanismos para se protegerem dos efeitos tóxicos induzidos por espécies reactivas de oxigénio (ROS), activando as defesas antioxidantes (Box et al., 2007). A actividade das enzimas envolvidas nestes mecanismos são potenciais biomarcadores, revelando um efeito biológico no organismo mediado por um contaminante com capacidade de sobre eles actuar (Box et al., 2007). As defesas antioxidantes, presentes em todos os organismos aeróbios, incluem enzimas antioxidantes (e.g. superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione reductase) e antioxidantes (vitaminas C e E, carotenóides, glutathione) cuja função é remover espécies reactivas de oxigénio, protegendo os organismos do stress oxidativo (Doyotte et al., 1997; Box, et al., 2007). As enzimas antioxidantes têm assim um papel importante na manutenção da homeostasia da célula. Os sistemas antioxidantes podem ser induzidos depois de ocorrer exposição a contaminantes, reflectindo uma adaptação das espécies às novas condições ambientais. Ou podem também ser inibidos, o que pode levar a efeitos tóxicos mediados por antioxidantes (Doyotte et al., 1997). Quando as defesas antioxidantes são ultrapassadas, o *stress* oxidativo pode produzir danos no DNA, inactivação enzimática e peroxidação dos constituintes da célula, especialmente peroxidação lipídica (Doyotte et al., 1997).

Avanços recentes no desenvolvimento de ensaios ecotoxicológicos com invertebrados do solo e no desenvolvimento de novos biomarcadores permitem estimativas mais confiantes do risco ecológico, mas muitas destas técnicas têm ainda de ser validadas para monitorização em situações no campo (Hankard et al., 2004). O uso de organismos do solo, especialmente invertebrados, para avaliação dos níveis de resíduos bioacumulados, tem-se tornado uma metodologia muito popular para avaliar risco ecológico imposto por locais contaminados (O'Halloran, 2006). Entre os invertebrados do solo, as minhocas têm várias características (e.g. biomassa significativa, comportamento, hábitos de vida) que

fazem delas bons bioindicadores da contaminação terrestre (Arnaud et al., 2000) dada a sua capacidade de acumular diversos contaminantes, como por exemplo metais (e.g. Cd, Pb) (Bundy et al., 2007). Processos mediados pelas minhocas como a drenagem, arejamento, incorporação e degradação de matéria orgânica são da maior importância para manter e aumentar a qualidade do solo (Peijnenburg et al., 1999). Consequentemente, determinadas espécies de minhocas foram seleccionadas, a nível da União Europeia, para o desenvolvimento e padronização de testes ecotoxicológicos, como o OECD (1984) (Arnaud et al., 2000). Durante o movimento através do solo, as minhocas contactam e interagem apenas com uma porção específica do químico disponível no ambiente. A interacção pode ocorrer através do contacto directo da epiderme com os químicos na fase aquosa ou na atmosfera do solo, assim como pela ingestão de solo ou de fracções específicas de solo (e.g. resíduos vegetais, partículas minerais). A fracção do químico biodisponível no ambiente com que a minhoca interage é denominada de fracção biodisponível ambientalmente. (Lanno et al., 2004). As características físico-químicas do solo (e.g. gradientes espaciais e temporais de carbono orgânico, pH, e granulometria), a fisiologia, os hábitos de vida de espécie determinam a biodisponibilidade químicos no solo (Lanno et al., 2004; Peijnenburg e Jager., 2003). Apesar de serem elementos essenciais, os metais acima de determinadas concentrações ou períodos de exposição são tóxicos para os organismos do solo e afectam a sua diversidade, abundância e distribuição. Assim, e dada a falta de conhecimento de base que permita estimar quantitativamente as fracções biodisponíveis de metais, ou de outros contaminantes, a partir das concentrações totais de metais das propriedades básicas do solo (Fernández et al., 2006); ou ainda a falta de consenso relativamente aos processos de extracção química mais adequados para determinação dessas mesmas fracções (Peijnenburg et al., 2007), reforçam a necessidade de desenvolvimento de ensaios *in situ* para o compartimento terrestre, que permitam avaliar os efeitos de múltiplos contaminantes, no seu estado real de especiação e mobilidade e em regimes ambientais variáveis.

1.1. Objectivos do trabalho

O trabalho desenvolvido, descrito e discutido na presente dissertação teve como objectivo a validação de um ensaio *in situ* com *Eisenia andrei*, proposto anteriormente por Antunes

et al. (*in press*), de forma a definir o período de exposição necessário para que se registem níveis significativos de bioacumulação de metais e de resposta ao stress oxidativo induzido, que permitam distinguir solos com diferentes níveis de contaminação.

2. Material e Métodos

2.1. Área de estudo

A Mina de urânio da Cunha Baixa localiza-se no concelho de Mangualde, na denominada “região uranífera das Beiras”, e esteve em exploração durante o período de 1967 a 1993 (Santos Oliveira e Ávila, 1998). A exploração, inicialmente ocorreu sob lavra subterrânea e só mais tarde sob exploração a céu aberto, recorrendo-se a processos de lixiviação estática *in situ* com H_2SO_4 (Santos Oliveira e Ávila, 1998; Pereira et al., 2007) para extracção de óxidos de urânio do minério pobre. Da exploração do minério resultou um espaço a céu aberto e a acumulação significativa de amontoados de escórias distribuídas por várias escombreyras (Santos Oliveira e Ávila, 1998). Actualmente, neste local estão a ser implementadas medidas de controlo e remediação de impactos ambientais, nomeadamente de neutralização do efluente ácido e de redução dos níveis de radionuclídeos e metais nele presentes. O poço principal, onde ocorria lavra subterrânea encontra-se, hoje em dia, inundado formando uma lagoa artificial repleta de efluente ácido (Santos Oliveira e Ávila, 1998). O nível desta lagoa é determinado essencialmente pelo nível do aquífero subterrâneo, bem como pela precipitação (Antunes et al., 2008). As áreas circundantes à zona de exploração apresentam-se altamente contaminadas pelo depósito de escórias, bem como de lamas provenientes da lagoa de tratamento do efluente ácido (Santos Oliveira e Ávila, 1998).

Com base em resultados provenientes de estudos prévios (Antunes et al., 2008; Antunes et al., *in press*; Pereira et al., 2008), nos quais se avaliou o nível de contaminação química e a toxicidade dos solos adjacentes à área mineira em causa, foram escolhidos 3 locais (A, B e I) para proceder à validação de um ensaio *in situ* com *Eisenia andrei*, desenvolvido anteriormente por Antunes et al. (*in press*). O local I foi escolhido como um potencial local de referência, por ser um dos mais afastados da zona de exploração subterrânea (Figura 1) e, por nos estudos realizados, não se ter verificado toxicidade sub-letal deste solo para *Eisenia andrei* (Antunes et al., 2007; Antunes et al., 2008; Pereira et al., 2008) e para *Folsomia candida* (dados não publicados). Os locais A e B apresentaram já toxicidade (Antunes et al., 2008, Pereira et al., 2008), sendo o primeiro localizado sob o poço de exploração subterrânea e o local B localizado numa área contígua à mina, onde ocorre deposição de lamas da lagoa de tratamento.

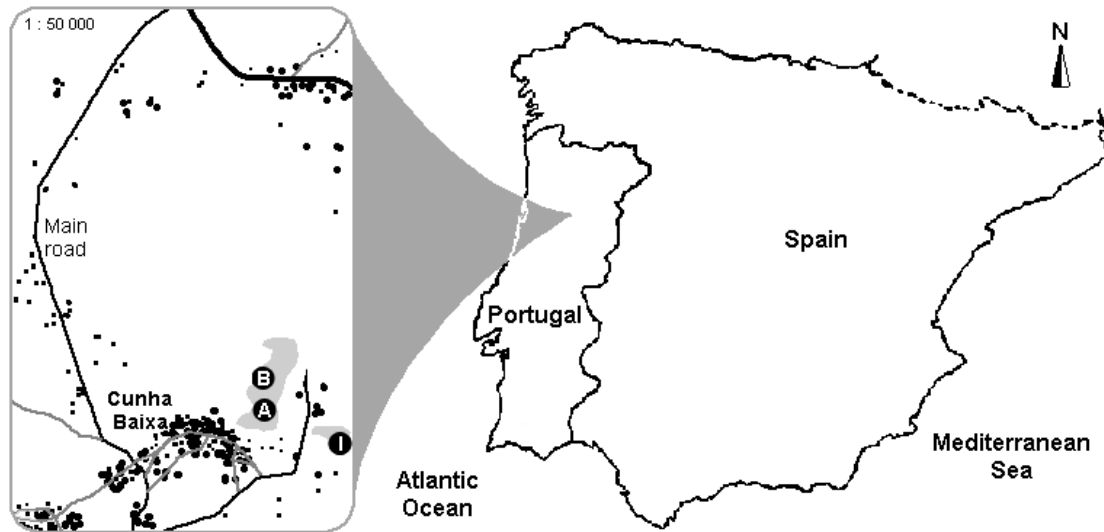


Figura 1 – Representação esquemática da área escolhida para o desenvolvimento do ensaio *in situ*. Os Locais A e B localizam-se junto à entrada da exploração subterrânea da mina e o Local I encontra-se a montante (potencial local de referência). (adaptado de Pereira et al., 2008)

2.2 Ensaio *in situ* com *Eisenia andrei*

O ensaio *in situ* com *Eisenia andrei* decorreu nos locais anteriormente descritos (A, B e I) e as câmaras de teste utilizadas foram as propostas e descritas anteriormente por Antunes et al. (*in press*) (Figura 2). Para a preparação do ensaio procedeu-se à colocação de aproximadamente 300gr de solo de cada local, recolhido no momento, (retirada a vegetação e as partículas mais grosseiras) nas câmaras de teste correspondentes ao solo natural (12 câmaras por local). Repetiu-se o procedimento para mais 3 câmaras de teste no local I onde foram colocadas cerca de 300gr de solo natural padronizado (Lufa 2.2). Os solos foram devidamente humedecidos com água da chuva artificial (Lægdsmand et al., 1999), de maneira a manter os organismos em condições propícias de humidade para a sua sobrevivência, durante o tempo de exposição. Procedeu-se ao início do ensaio *in situ* com a colocação de 5 minhocas em cada câmara de teste. De seguida, as câmaras foram fechadas, com uma tampa e colocadas numa depressão feita no solo (Figura 2). As câmaras foram tapadas com solo até à parte superficial da câmara de teste, sem tapar a tampa de maneira a permitir o arejamento das câmaras, e finalmente cobertas por um saco plástico para proteger da chuva e da incidência directa do sol (Figura 3).



Figura 2 – Início do ensaio *in situ* com a introdução dos organismos em estudo (*E. andrei*) nas câmaras-teste (à esquerda) e posterior colocação das câmaras em depressões feitas no terreno (à direita).



Figura 3 – Câmaras-teste já dispostas para início do ensaio *in situ*, enterradas até à tampa no solo local (à esquerda) e protecção do ensaio com um saco plástico de modo a evitar a acção directa da chuva e sol (à direita).

A humedificação do solo nas câmaras foi reposta sempre que os solos apresentaram deficiência de água, sendo que este ajuste ocorreu nos períodos de observação do ensaio. O ensaio decorreu durante 14 dias. Ao fim de 2 dias de exposição foram recolhidas 3 câmaras teste em cada local, bem como as 3 câmaras teste com o solo Lufa 2.2 expostas no solo I. Ao fim de 4, 7 e 14 dias foram recolhidas 3 câmaras teste em cada solo (A, B e I), perfazendo uma recolha de 9 câmaras teste por cada período de exposição. Findo cada período de exposição as câmaras de teste foram removidas do campo e transportadas de imediato para o laboratório. Já no laboratório, recolheram-se amostras de solo de cada câmara para caracterização física e química do solo (pH, condutividade, conteúdo em água e matéria orgânica). Nas câmaras removidas após 14 dias de exposição foi ainda retirada uma porção de solo para caracterização do conteúdo em metais nos solos naturais, enquanto que as amostras de Lufa 2.2., para o mesmo efeito são correspondentes ao dia 2 no Local I. As câmaras com solo Lufa 2.2. expostas apenas dois dias, destinaram-se apenas

a validar as boas condições fisiológicas dos organismos, assim como os níveis de metais nos organismos, sem exposição ao solo contaminado. Em cada período de amostragem foram recolhidos os cinco organismos teste de cada câmara, os quais foram submersos em água destilada durante alguns minutos para se proceder à lavagem dos organismos e assim se retirar o excesso de partículas de solo agarradas à superfície da epiderme. Este procedimento teve também como objectivo que os organismos expelissem partículas de solo por regurgitação. Após este procedimento, os organismos foram divididos em dois grupos: 1) três organismos foram congelados a -80°C , individualmente, para posterior quantificação de biomarcadores de stress oxidativo e 2) dois organismos foram congelados a -4°C para análise do conteúdo em metais no organismo.

2.3 Caracterização físico-química dos solos

Procedeu-se à determinação de propriedades físicas e químicas do solo (pH, condutividade, conteúdo em água, conteúdo em matéria orgânica e concentrações pseudo-totais de metais) com a sub-amostra de cada solo proveniente de cada câmara de teste, após 14 dias de exposição. O pH (H_2O) e a condutividade do solo foram medidos numa suspensão de solo-água (1:5 m/v), de acordo com o método descrito em FAOUN (FAOUN, 1984). Para a determinação do pH, foram pesadas aproximadamente 10gr de solo em fracos de polipropileno. Seguidamente foi adicionada água destilada (50ml) e a suspensão foi colocada a agitar durante 15min. Findo este tempo, seguiu-se um período de repouso de uma hora e por fim a medição do valor de pH, com um medidor de pH pré-calibrado WTW 330/SET-2. A condutividade foi medida na mesma suspensão, a qual foi deixada em repouso durante a noite (SPAC, 2000) utilizando um condutímetro LF 330/SET. O conteúdo em água foi determinado pela diferença de peso de cada porção de solo seca ao ar e o peso da mesma porção após secagem à estufa, a 105°C , durante 24h (SPAC, 2000). O conteúdo em matéria orgânica foi determinado nas mesmas porções de solo, pela diferença de peso após queima na mufla, a 450°C , durante 8h (SPAC, 2000).

Para determinação das concentrações pseudo-totais de metais no solo, foi realizada uma digestão ácida. Assim para o efeito foi pesada uma grama de solo de cada câmara-teste, (do período de 14 dias de exposição) a qual foi digerida com *acqua regia* (3 ml de ácido hidrocloreto 37% *Pro-Analysis* Panreac®) + 1 ml de ácido nítrico 65% “*Pro-Analysis* Merck®”) num digestor de Teflon. A mistura foi deixada num banho de areia a 100°C

durante 12 horas. Após este período foram adicionados 10 ml de HNO₃ aos frascos e deixados a repousar durante 12 horas. A solução final foi filtrada através de um filtro (25mm de diâmetro com membrana de acetato de celulose de 0,2µm de poro), para retirar as pequenas partículas que se encontravam em suspensão, de modo a não interferir na análise química. O filtrado foi transferido para frascos de polipropileno e o volume ajustado a 20 ml com água destilada. As concentrações pseudo-totais dos metais seleccionados foram analisadas por espectrofotometria de massa - ICP-MS (APHA-AWWA-WEF, 1995).

2.4 Conteúdo de metais em *Eisenia andrei*

Os organismos teste foram descongelados à temperatura ambiente e posteriormente, colocados na estufa a 60°C até atingirem um peso constante. Cada conjunto de 2 minhocas, correspondentes a cada câmara de teste foi colocado em tubos de polipropileno, ao qual foi adicionado 1 ml de ácido nítrico 65% “Pro-Analysis Merck®”. As amostras foram deixadas num banho de areia a 60°C, durante 12 horas, de modo a ocorrer a digestão dos tecidos. Após o arrefecimento das amostras, adicionou-se a cada uma 0,5 ml de peróxido de hidrogénio, 30% “Pro-Analysis Merck®”. Seguidamente, a mistura foi colocada novamente no banho de areia a 60°C ao longo de mais 12 horas. Por fim, as amostras foram retiradas do banho e deixadas arrefecer. Como procedimento efectuado para as amostras de solo, estas foram filtradas por um filtro (25mm de diâmetro e com membrana de acetato de celulose de 0,2 µm de poro) e os extractos finais ajustados a 10ml com água destilada e analisados para metais seleccionados usando espectrofotometria ICP-MS (APHA-AWWA-WEF, 1995).

Com os resultados obtidos da concentração pseudo-total de metais no solo e nos organismos expostos foram calculados os factores de bioconcentração de metais (FBC) nos organismos teste. Deste modo, procedeu-se ao cálculo da razão entre o conteúdo em metais quantificados em *E. andrei* (em µg g⁻¹ de peso seco) e o conteúdo em metais quantificado para cada solo (µg g⁻¹ de solo), segundo a fórmula:

$$\text{FBC} = [\text{metal}]_{\text{minhoca}} / [\text{metal}]_{\text{solo}}$$

2.5 Biomarcadores de stress oxidativo

A actividade de biomarcadores de stress oxidativo, nomeadamente das enzimas Catalase (CAT), Glutathione-S-Transferase (GST) e a peroxidação lipídica (TBARS), foi avaliada em cada 1 dos 3 organismos teste de cada câmara. Para a obtenção de várias alíquotas da biomassa dos organismos para quantificação dos biomarcadores, os mesmos foram descongelados no gelo e homogeneizados em 2ml de tampão fosfato (50mM, pH=7.0 com 0.1% TRITON X-100). Os homogeneizados foram centrifugados a 4000g durante 10 minutos e os respectivos sobrenadantes divididos em 4 alíquotas, uma para cada determinação (CAT, GST, TBARS e quantificação de proteína total). Tanto as alíquotas como o restante sobrenadante foram armazenadas a -80°C até as determinações serem possíveis.

Catalase – a actividade da enzima catalase foi determinada nos homogeneizados através do método de espectrometria descrito por (Aebi, 1984). Este método envolve a monitorização do consumo de peróxido de hidrogénio, a um comprimento de onda de 240 nm ($\epsilon = 0.0394 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), durante um período de 30 segundos em que os resultados se expressam em μmol por minuto, por miligrama de proteína.

Glutathione S-transferases - a actividade da enzima GST foi determinada segundo o método descrito por Habig et al. (1974). As enzimas glutathione-S-transferases catalisam a conjugação do substrato 1-cloro-2,4-dinitrobenzeno (CDNB) com a glutathione, formando um tioéter ($\epsilon = 9.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), cuja formação pode ser medida por espectrometria através do aumento da absorvância a um comprimento de onda de 340 nm, durante 5 minutos. Os resultados foram expressos em milimols de tioéter produzido por minuto, por miligrama de proteína.

TBARS - a extensão de peroxidação lipídica foi medida pela quantificação de substâncias reactivas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), de acordo com o protocolo descrito por Buege e Aust (1978). Esta metodologia é baseada na reacção dos produtos da peroxidação lipídica, tais como malonildialdeído (MDA), com o ácido 2-tiobarbitúrico (TBA). A quantidade de TBARS foi medida por espectrometria com uma determinação única, a um comprimento de onda de 535 nm ($\epsilon = 156 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), e os resultados expressos como nanomol de MDA equivalentes por mg de proteína na amostra.

Proteína total - a concentração de proteína de cada amostra (organismo) foi determinada em triplicado, de acordo com o método de espectrometria de Bradford (1976)

adaptado a leitor de microplacas. Todos os biomarcadores (Catalase, GST e TBARS) foram expressos em função da quantidade de proteína presente na amostra correspondente. Para fins estatísticos e para reduzir a variabilidade das determinações bioquímicas, determinou-se a média dos valores registados para cada um dos biomarcadores, para os 3 organismos presentes em cada câmara de teste.

2.6 Análise estatística

De forma a validar as diferenças entre os solos seleccionados, para a validação do ensaio *in situ*, os quais já haviam sido caracterizados por Pereira et al. (2008), realizaram-se duas análises de variância multivariada (MANOVA), reunindo, a primeira, os dados registados para todos os parâmetros físico-químicos (pH, condutividade, humidade e MO) e a segunda, as concentrações pseudo-totais de metais no solo. Posteriormente, foi realizada uma ANOVA unifactorial para cada parâmetro e para cada metal avaliado de forma a determinar qual deles contribuiu de forma mais significativa, para as diferenças registadas entre solos, com base nos valores de F (Quinn e Keough, 2002).

De forma a determinar qual o tempo mínimo necessário de exposição, a um solo contaminado com metais, para obtermos uma resposta significativa de cada um dos biomarcadores avaliados, realizaram-se análises de variância de uma via (*do inglês*: One-Way ANOVA), para cada um dos biomarcadores, para os valores de FBCs e para cada um dos solos testados. Sempre que se registaram diferenças significativas, foi realizado um teste de Dunnett tendo como referência o solo controlo (Lufa 2.2).

Para determinar o tempo mínimo necessário para se distinguir solos com diferentes níveis de contaminação realizou-se também uma ANOVA bifactorial. Esta análise permite não só determinar diferenças entre locais e diferenças entre tempos de exposição, como sobretudo avaliar se a interacção entre os dois factores é significativa (Zar, 1999). Estas análises foram efectuadas para cada biomarcador isoladamente e para os valores de FBC. Sempre que se registaram diferenças significativas, a Anova foi seguida de um teste Tukey de comparação múltiplas. Todas as análises foram testadas para diferenças significativas com um nível de significância de $p \leq 0,05$.

3. Resultados

3.1 Caracterização físico-química dos solos

Nas Tabelas 1 e 2 apresentam-se os valores médios registados para os parâmetros físico-químicos gerais e para as concentrações pseudo-totais de metais registadas nos solos analisados. A escolha dos solos utilizados para o ensaio *in situ*, como já referido anteriormente, foi baseada em dados de estudos anteriores (Antunes et al., 2008; Pereira et al., 2008), no entanto os resultados obtidos neste estudo conseguiram demonstrar mais uma vez que estes solos apresentam características distintas, sendo significativamente diferentes quando comparados, através de uma análise de variância multivariada (MANOVA), que integrou os valores médios de todos os parâmetros físico-químicos avaliados (MANOVA Pillai's trace = 2,98; $F_{(12,21)} = 363,92$; $p \leq 0,001$). Assim, relativamente aos valores de pH (Tabela 1), o solo A foi o que apresentou valores mais acídicos ($pH \approx 4,6$). Os solos I e Lufa 2.2. apresentaram valores igualmente ácidos, enquanto que o solo B apresentou valores de pH mais próximos da neutralidade ($\approx 7,3$), para qualquer um dos períodos de exposição. A condutividade foi o parâmetro que apresentou maior discrepância, uma vez que o solo B apresentou valores bastante mais elevados em relação aos outros solos, apresentando valores perto dos 500 $\mu S/cm$. Ainda na Tabela 1 é possível observar os valores médios de humidade e matéria orgânica, registados nos diferentes solos naturais e no solo Lufa 2.2. Relativamente a estes parâmetros observa-se um padrão semelhante, onde o solo B se salienta apresentando os valores mais elevados, para ambos, comparativamente aos restantes solos (Humidade $\approx 30\%$ e MO $\approx 8\%$). No entanto, de acordo com o esperado nenhum destes parâmetros apresentou grandes variações ao longo dos 14 dias de exposição, pelo que se poderá dizer que as propriedades do solo no interior das câmaras se mantiveram ao longo do período de exposição do ensaio *in situ*.

Tabela 1 – Valores médios e respectivos erros padrão dos parâmetros físico-químicos gerais registados nas amostras de solos naturais (A, B e I) e no solo referência (Lufa 2.2). Os dados referentes ao solo Lufa 2.2 apresentam-se em intervalos de valores medidos. **Negrito** – valores mais elevados

	Dias	Lufa	A	B	I
pH	2	5,63-6,15	4,51±0,0	7,24±0,1	6,01±0,0
	4		4,62±0,0	7,33±0,0	6,11±0,0
	7		4,73±0,0	7,33±0,0	5,99±0,1
	14		4,66±0,0	7,27±0,0	6,23±0,1
Condutividade (µS/cm)	2	46,23-52,10	30,53±1,0	487,33±3,3	9,23±0,5
	4		23,33±1,1	474,33±8,3	8,58±0,3
	7		26,87±1,5	463,33±4,9	12,64±4,5
	14		24,13±1,5	475,67±1,2	9,90±1,0
Humidade (%)	2	1,47-3,08	1,96±0,2	30,31±1,2	1,42±0,1
	4		3,63±1,0	38,24±0,9	5,90±0,2
	7		1,52±0,0	13,86±0,3	1,26±0,0
	14		2,22±0,5	28,04±1,6	1,13±0,2
Matéria Orgânica (%)	2	3,28-3,93	0,67±0,0	8,50±0,9	1,68±0,6
	4		0,87±0,0	9,11±0,9	1,16±0,1
	7		0,63±0,0	7,60±0,2	1,51±0,0
	14		0,65±0,1	7,52±0,4	1,13±0,0

De modo a complementar a análise físico-química do solo, foi também determinado o conteúdo em metais do solo (Tabela 2). Mais uma vez, e de maneira a demonstrar as diferenças significativas entre os solos testados, realizaram-se duas MANOVAs desta vez tendo em conta o conteúdo em metais do solo (MANOVA Pillai's trace = 2,98; $F_{(21,12)} = 96,66$; $p \leq 0,001$ para - Al, Ba, Be, Cd, Fe, Mn e Ni; MANOVA Pillai's trace = 2,75; $F_{(12,21)} = 19,88$; $p \leq 0,001$ para - Pb, Sr, U e Zn). Esta análise veio confirmar a existência de diferenças significativas entre os solos naturais, relativamente ao conteúdo em metais do solo, à semelhança do anteriormente demonstrado com base nos parâmetros físico-químicos. Na Tabela 2 é possível verificar que os elementos que apresentaram concentrações mais elevadas, em todos os solos naturais da Cunha Baixa, foram o Al e o Fe. O solo B destaca-se pelo facto de ter apresentado as concentrações mais elevadas da maioria dos elementos (Al, Be, Cd, Fe, Mn, Ni e Zn), sendo neste solo que as

concentrações de Al e Fe se apresentaram mais elevadas, em relação aos outros solos. O solo A apresentou apenas concentrações elevadas de Al e Fe, enquanto que o solo I, apresentou concentrações elevadas dos dois elementos referidos (Al e Fe) e ainda de Mn. O solo Lufa 2.2, além de também apresentar concentrações elevadas de Al e Fe, possuía ainda concentrações altas de Ba, Pb, Sr e U.

Tabela 2 – Conteúdo de metais ($\mu\text{g g}^{-1}$) (média±erro padrão) nos diferentes solos naturais após exposição *in situ*. Análise dos solos: Lufa 2.2 ao fim de 2 dias e ao fim de 14 dias no caso dos solos naturais. **Negrito** - valores mais elevados

	Lufa	A	B	I
Al	3656,33±113,2	544,67±7,6	26023,29±160,0	3963,33±149,5
Ba	48,21±4,0	11,31±2,05	8,50±8,11	7,66±3,31
Be	0,34±0,0	0,12±0,0	40,40±0,4	1,29±0,1
Cd	0,09±0,0	0,01±0,0	1,90±0,0	0,03±0,0
Fe	3345,00±366,8	617,38±7,4	8570,07±192,8	2650,00±99,7
Mn	119,38±4,5	8,42±1,4	3321,36±42,1	287,83±9,7
Ni	2,62±0,2	0,29±0,0	53,08±0,4	2,08±0,2
Pb	10,26±0,2	0,99±0,0	6,68±0,9	9,22±0,6
Sr	8,68±0,1	0,15±0,0	1,76±0,0	7,51±0,2
U	1082,27±280,3	13,34±0,2	224,16±5,1	16,36±0,5
Zn	13,01±0,3	2,78±0,1	219,67±2,1	27,59±1,1

A Tabela 3 apresenta os dados obtidos para as análises de variância unifactoriais efectuadas para cada um dos parâmetros determinados ao fim de 14 dias de exposição. A análise permitiu verificar que tantos os parâmetros físico-químicos como os 11 metais analisados (excepto o Ba) demonstraram diferenças significativas entre os solos utilizados, justificando a sua escolha para a realização do ensaio *in situ* (Tabela 3). Pela análise dos resultados apresentados na Tabela 3 observa-se que o parâmetro com a contribuição mais significativa para essas diferenças foi a condutividade ($F=45684,654$ a negrito na Tabela 3). Para além da condutividade, só alguns dos metais analisados é que tiveram uma contribuição significativa para o registo destas diferenças (nomeadamente Al, Be e Ni – a negrito na Tabela 3). Os restantes parâmetros analisados poderão assim ser ordenados por ordem decrescente do valor de contribuição para as diferenças registadas $\text{Zn} > \text{Mn} > \text{Cd} > \text{U} > \text{Sr} > \text{Fe} > \text{pH} > \text{MO} > \text{Humidade} > \text{Pb} > \text{Ba}$ (Tabela 3).

Tabela 3 – Valores obtidos nas ANOVAs unifactoriais para os parâmetros físico-químicos e para o conteúdo em metais dos solos (A, B e I), ao fim de 14 dias de exposição. **Negrito** – F= valores mais elevados; $p \leq 0,05$

	F	g.l.	p
pH	709,493	(2,6)	< 0,001
Cond	45684,654	(2,6)	< 0,001
Humidade	228,313	(2,6)	< 0,001
MO	273,915	(2,6)	< 0,001
Al	11949,611	(2,6)	< 0,001
Ba	0,136	(2,6)	0,876
Be	10790,221	(2,6)	< 0,001
Cd	3786,988	(2,6)	< 0,001
Fe	1085,450	(2,6)	< 0,001
Mn	5412,189	(2,6)	< 0,001
Ni	12286,875	(2,6)	< 0,001
Pb	49,960	(2,6)	< 0,001
Sr	1597,324	(2,6)	< 0,001
U	1690,394	(2,6)	< 0,001
Zn	7380,826	(2,6)	< 0,001

3.2 Conteúdo de metais em *Eisenia andrei*

A variação do conteúdo em metais nos organismos teste, entre os diferentes períodos de exposição, pode ser observado na Figura 4. Note-se, que o elemento mais acumulado foi o Al, nos organismos expostos ao solo B, com valores superiores a 20 000 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco de *E. andrei* após um período de exposição de 14 dias. Os organismos expostos aos solos A e I demonstram também um elevado teor de Al, sendo contudo muito inferior ao registado nos organismos expostos ao solo B, para o mesmo período de exposição. Além do Al, os metais que ocorrem em maiores concentrações nos organismos teste foram o Fe e o Mn, sendo os valores mais elevados de aproximadamente 4000 $\mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco de *E. andrei*. Assim, tal como o Al, o teor em Mn foi sobretudo elevado nos organismos

expostos ao solo B; já em relação ao Fe, a concentração deste metal foi superior nos organismos expostos ao solo I. Outro dos metais que foi bioacumulado em níveis elevados ($\approx 1000 \mu\text{g g}^{-1}$ de peso seco de *E. andrei*) foi o Ba, mais uma vez nos organismos expostos ao solo B.

Em resumo, como se pode verificar na Figura 4, na generalidade dos metais analisados, os organismos expostos ao solo B foram os que apresentaram a maior concentração de metais analisados (excepção para o Fe, Pb e U), apresentando frequentemente um aumento das concentrações ao longo da exposição ao ensaio. As excepções referidas (Fe, Pb e U) foram registados em maior concentração nos organismos expostos ao solo I. Porém, no caso da exposição ao solo I, as concentrações não aumentam ao longo do tempo como acontece para os metais no solo B, mas diminuem no caso do Fe e do U e mantêm-se constantes ao longo da exposição, para o Pb. Os organismos expostos ao solo A apresentaram concentrações elevadas de U e Zn, além de Al e Fe, tal como já foi referido. No entanto, é possível verificar que as de concentrações destes metais tenderam a manter-se constantes nos organismos expostos ao solo A, ocorrendo apenas pequenas variações ao longo dos 14 dias de exposição (Figura 4). Na exposição ao solo I verificamos concentrações elevadas de Al, Fe, Mn, U e Zn nos organismos teste. Também na exposição a este solo não se verificam aumentos pronunciados ao longo da exposição, verificando-se mesmo diminuições, como no caso do Fe e do U.

Os metais bioacumulados em menor concentração, nos organismos teste, foram o Be, o Cd, o Ni, o Sr e o Pb, com concentrações inferiores a $50 \mu\text{g g}^{-1}$ peso seco de *E. andrei* (Figura 4). Contudo, mais uma vez estes elementos foram bioacumulados sobretudo pelos organismos expostos ao solo B, excepto o Pb que apresentou um teor mais elevado nos organismos expostos ao solo I.

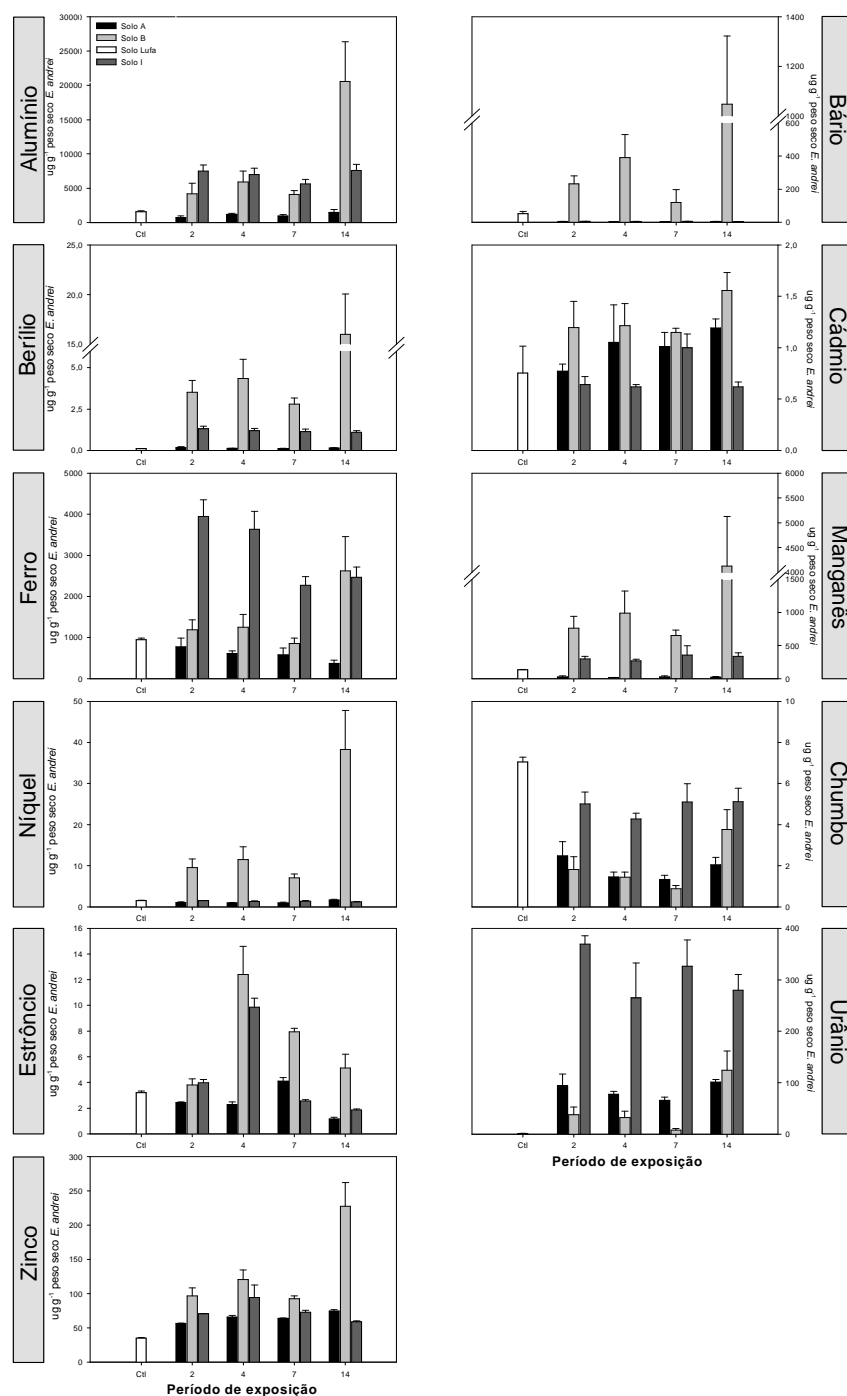


Figura 4 – Variação do conteúdo em metais nos organismos (*E. andrei*) expostos *in situ*, para cada local e durante os períodos de exposição definidos. As barras de erro correspondem ao erro padrão.

3.3 Factores de bioconcentração (FBCs) em *Eisenia andrei*

No que refere aos valores de FBC calculados (Tabela 4) foram registadas diferenças significativas para todos os elementos metálicos, entre os organismos expostos aos diferentes solos naturais. No que refere ao tempo de exposição, apenas para o Mn e para o Pb, não se registou um efeito significativo deste factor. A interacção entre os factores TEMPO X SOLO, foi significativa, para todos os elementos excepto para o Mn, o que indica que as diferenças entre locais, estabelecidas com base nos valores de FBCs, poderão ser interpretadas de forma diferente consoante o tempo de exposição considerado para o ensaio. Os FBCs calculados nos organismos teste, sujeitos aos diferentes períodos de exposição, podem ser observados na Tabela 4. Os valores de FBCs mais elevados, para os 14 dias de exposição, variam em relação ao solo a que os organismos estiveram expostos. No solo A, destacam-se os valores mais elevados de bioacumulação (FBCs) para os elementos Cd, Sr e Zn; para o solo B, apenas o Ba se salientou com valores de FBCs de 123,2, enquanto que no solo I se registaram valores de FBCs mais elevados para os elementos Cd e U. Relativamente aos valores de FBCs para o solo Lufa 2.2, esperava-se que fossem mais baixos que nos solos naturais contaminados, no entanto observaram-se valores de bioacumulação na mesma ordem de grandeza dos outros solos, mesmo com uma exposição reduzida, de apenas 2 dias. No que refere aos FBCs calculados para o Al e o Fe, os elementos registados em maior concentração em todos os solos, verifica-se que os mesmos estão muito próximos de 1, o que significa que estes elementos são muito bioacumulados pelos animais, especialmente nos solos A e I. Por oposição, no solo B, onde as concentrações mais elevadas de Al e Fe foram registadas, a bioacumulação destes elementos é reduzida, muito provavelmente por mecanismos de competição com outros elementos que poderão estar mais biodisponíveis neste solo (e.g. Ba).

Tabela 4 – Factores de bioconcentração (FBCs) para *Eisenia andrei* calculados para os diferentes períodos de exposição *in situ* a cada solo natural e ao solo Lufa 2.2. Resumo das Anovas bifactoriais para os FBCs para as variáveis solo e tempo de exposição (TE).

	dias	Lufa	A	B	I	ANOVA bifactorial (Solo x Tempo de Exposição)
Al	2	0,4	1,3	0,2	1,9	Solo $p<0,001$ TE $p=0,026$ Interacção $p=0,035$
	4		2,2	0,2	1,8	
	7		1,8	0,2	1,4	
	14		2,7	0,8	1,9	
Ba	2	1,1	0,4	27,4	0,7	Solo $p<0,001$ TE $p<0,001$ Interacção $p<0,001$
	4		0,3	46,0	0,6	
	7		0,2	14,1	0,6	
	14		0,3	123,2	0,6	
Be	2	0,3	1,4	0,1	1,0	Solo $p<0,001$ TE $p=0,002$ Interacção $p=0,006$
	4		1,0	0,1	0,9	
	7		0,9	0,1	0,9	
	14		1,2	0,4	0,8	
Cd	2	8,5	111,2	0,6	22,3	Solo $p<0,001$ TE $p<0,001$ Interacção $p<0,001$
	4		151,7	0,6	21,6	
	7		145,7	0,6	34,8	
	14		171,7	0,8	21,6	
Fe	2	0,3	1,3	0,1	1,5	Solo $p<0,001$ TE $p<0,001$ Interacção $p=0,001$
	4		1,0	0,1	1,4	
	7		0,9	0,1	0,9	
	14		0,6	0,3	0,9	
Mn	2	1,1	3,6	0,2	1,0	Solo $p=0,003$ TE $p=0,948$ Interacção $p=0,283$
	4		2,1	0,3	0,9	
	7		3,7	0,2	1,3	
	14		3,1	1,2	1,2	
Ni	2	0,6	3,6	0,2	0,7	Solo $p<0,001$ TE $p<0,001$ Interacção $p<0,001$
	4		3,3	0,2	0,6	
	7		3,4	0,1	0,7	
	14		5,9	0,7	0,6	
Pb	2	0,7	2,5	0,3	0,5	Solo $p<0,001$ TE $p=0,054$ Interacção $p=0,002$
	4		1,5	0,2	0,5	
	7		1,4	0,1	0,6	
	14		2,1	0,6	0,6	
Sr	2	0,4	16,6	2,2	0,5	Solo $p<0,001$ TE $p<0,001$ Interacção $p<0,001$
	4		15,6	7,1	1,3	
	7		28,0	4,5	0,3	
	14		7,9	2,9	0,2	
U	2	0,0	7,0	0,2	22,6	Solo $p<0,001$ TE $p<0,001$ Interacção $p<0,001$
	4		5,8	0,1	16,2	
	7		4,9	0,0	20,0	
	14		7,6	0,6	17,1	
Zn	2	2,7	20,4	0,4	2,6	Solo $p<0,001$ TE $p<0,001$ Interacção $p<0,001$
	4		23,7	0,5	3,4	
	7		23,0	0,4	2,6	
	14		27,0	1,0	2,1	

De modo a verificar de que forma bioacumulação de metais variou ao longo do tempo de exposição, foi realizada uma ANOVA de uma via, seguida de um teste de

Dunnett (sendo o controlo o solo Lufa 2.2), para os valores de FBC para cada metal e cada solo (Tabela 5). Como é possível observar os organismos lidam de forma diferente com os diferentes elementos metálicos, o que dá origem a variações temporais nos valores de FBCs.

Tabela 5 – Resumo das ANOVAs unifactoriais realizadas para comparar os valores de FBCs para cada metal, entre os quatro períodos de exposição. Análise realizada para cada solo (A, B e I) de forma independente.

	Solo A			Solo B			Solo I		
	F	g.l.	p	F	g.l.	p	F	g.l.	p
Al	2,173	4,10	0,146	5,609	4,10	0,012	2,527	4,10	0,107
Ba	7,358	4,10	0,005	7,079	4,10	0,006	1,283	4,10	0,340
Be	3,104	4,10	0,067	11,697	4,10	<0,001	7,317	4,10	0,005
Cd	6,395	4,10	0,008	2,957	4,10	0,075	14,698	4,10	<0,001
Fe	2,912	4,10	0,078	4,033	4,10	0,034	15,823	4,10	<0,001
Mn	0,912	4,10	0,493	0,976	4,10	0,463	0,425	4,10	0,787
Ni	17,799	4,10	<0,001	1,014	4,10	0,445	2,217	4,10	0,140
Pb	3,342	4,10	0,055	9,572	4,10	0,002	2,156	4,10	0,148
Sr	84,371	4,10	<0,001	3,152	4,10	0,064	92,069	4,10	<0,001
U	13,469	4,10	<0,001	6,902	4,10	0,006	12,488	4,10	<0,001
Zn	331,384	4,10	<0,001	1,652	4,10	0,237	3,429	4,10	0,052

Assim, no solo B verificou-se que os valores de FBC aumentaram, ao longo do tempo de exposição, para todos os metais, revelando no entanto diferenças significativas entre tempos de exposição apenas para alguns elementos (Al, Ba, Be, Fe, Pb e U) (Tabelas 4 e 5). Quando comparados com o solo Lufa 2.2, através de um teste Dunnett, verificamos que para o Be e o Pb, a bioacumulação foi significativamente superior logo a partir do dia 2 até ao dia 7, havendo posteriormente uma pequena recuperação. Nos outros elementos o padrão registado foi menos consistente, na medida em que se registaram diferenças significativas entre os FBCs após 2 e 4 dias de exposição, comparativamente à Lufa 2.2, para o Al; apenas após 7 dias para o Fe e, após 14 dias, para o Ba e o U.

Pelo contrário, no solo I os valores de bioacumulação diminuem ao longo da exposição, sendo esta bioacumulação significativamente diferente também para apenas um grupo de elementos (Be, Cd, Fe, Sr e U) (Tabelas 4 e 5). Dentro destes metais com excepção do Sr, todos apresentam valores de FBC significativamente superiores aos registados nos organismos expostos ao solo Lufa 2.2., logo após o segundo dia de exposição e para o restante tempo de exposição. No caso do Sr, o valor de FBC só é significativamente superior ao registado no solo Lufa 2.2 após 4 dias de exposição.

E finalmente no solo A, os valores de acumulação não se comportam numa direcção específica, como o solo B e I, apresentando aumento da bioacumulação para uns elementos e diminuição para outros (Tabela 4). No entanto, apenas alguns elementos apresentam valores de FBC significativamente superiores aos registados nos organismos expostos ao solo Lufa 2.2, nomeadamente Ba, Cd, Ni, Sr, U e Zn (Tabela 5). Assim, o Cd, o Ni, o U e o Zn apresentaram FBC significativamente superiores aos registados na Lufa 2.2, a partir do segundo dia de exposição até ao final do ensaio, à excepção do Cd, que apresenta apenas a partir do quarto dia de exposição; já o Ba e o Sr apresentaram um decréscimo significativo na bioacumulação, também a partir do 2º dia de exposição e até ao fim do ensaio.

3.4 Biomarcadores de stress oxidativo

A actividade dos biomarcadores de stress oxidativo determinados está representada nas **Figuras 5, 6 e 7**. Os gráficos demonstram o comportamento destes biomarcadores ao longo do tempo, nos diferentes solos naturais avaliados no ensaio *in situ*. As **Figuras 5, 6 e 7** correspondem à variação dos valores de TBARS (do inglês: *thiobarbituric acid reactive substances*), da actividade da enzima Catalase e da actividade das enzimas Glutathione-S-Transferases (GSTs), respectivamente.

Na Figura 5 verifica-se uma tendência para o aumento dos valores de TBARS ao longo do tempo de exposição, nos organismos expostos aos três solos naturais. Contudo, os valores de TBARS referentes aos organismos expostos ao solo I foram os mais elevados entre os três solos. Os valores de TBARS determinados nos organismos-teste foram significativamente diferentes entre solos (ANOVA bifactorial: $F_{(2,30)} = 12,410$; $p < 0,001$) e entre tempos de exposição (ANOVA bifactorial: $F_{(4,30)} = 12,203$; $p < 0,001$) a que foram sujeitos. A interacção entre estes dois factores foi igualmente significativa (ANOVA bifactorial: $F_{(8,30)} = 3,264$; $p = 0,009$). O teste de Tukey efectuado demonstrou que tanto os

organismos expostos ao solo A como ao solo B apresentaram valores significativamente diferentes dos do Solo I.

Na Figura 5 estão representadas as diferenças significativas entre os valores de TBARS registados para os vários tempos de exposição e os registados no solo Lufa 2.2. (*). Assim, verificaram-se diferenças significativas entre os valores de TBARS registados nos organismos expostos por diferentes períodos ao solo A (ANOVA unifactorial: $F = 29,448$; $p < 0,001$), sendo os valores referentes aos dias 2 e 7 significativamente diferentes dos da Lufa 2.2 (resultados do teste de Dunnett). O mesmo foi observado para o solo B (ANOVA unifactorial: $F = 32,888$; $p < 0,001$), onde os valores registados após 7 e 14 dias foram significativamente diferentes dos da Lufa 2.2.

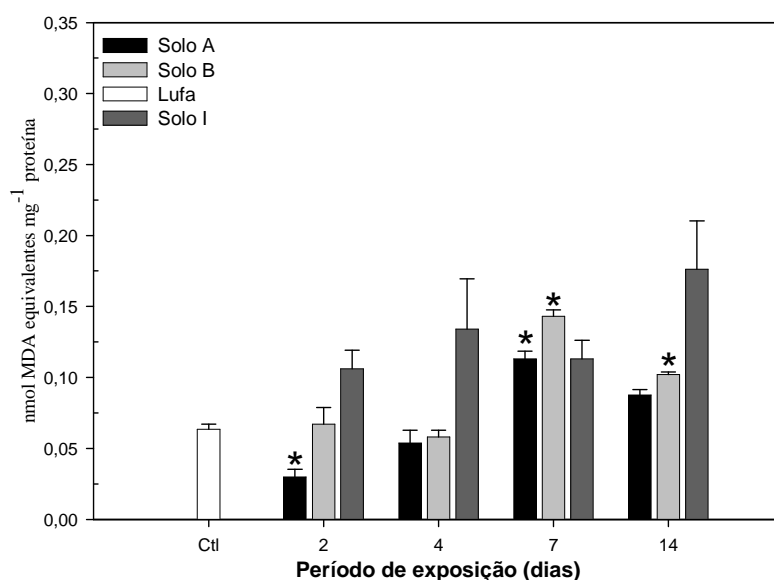


Figura 5 – Variação dos valores de TBARS determinados em *E. andrei* exposta *in situ* aos solos A, B e I, para os diferentes períodos de exposição (*significativamente diferente do solo Lufa 2.2, com $p < 0,05$).

No que refere à actividade da enzima catalase verificaram-se respostas semelhantes para os organismos expostos ao solo A e ao solo B (Figura 6). Em qualquer dos solos registou-se uma diminuição dos valores da actividade da enzima catalase do início da exposição até ao dia 7, após o que houve uma recuperação até ao dia 14. Já no solo I os organismos apresentaram um comportamento contrário, sofrendo um aumento gradual dos valores de actividade desta enzima desde o início da exposição até ao final desta. Contrariamente aos TBARS, que apresentaram diferenças significativas para todos os factores, os valores da catalase demonstraram ser significativamente diferentes apenas para

o tempo de exposição (ANOVA bifactorial: $F_{(4,30)} = 3,006$; $p = 0,034$). Contudo, o teste de Dunnett não foi capaz de discernir para que tempos de exposição a actividade da enzima catalase foi significativamente diferente da registada no solo Lufa 2.2.

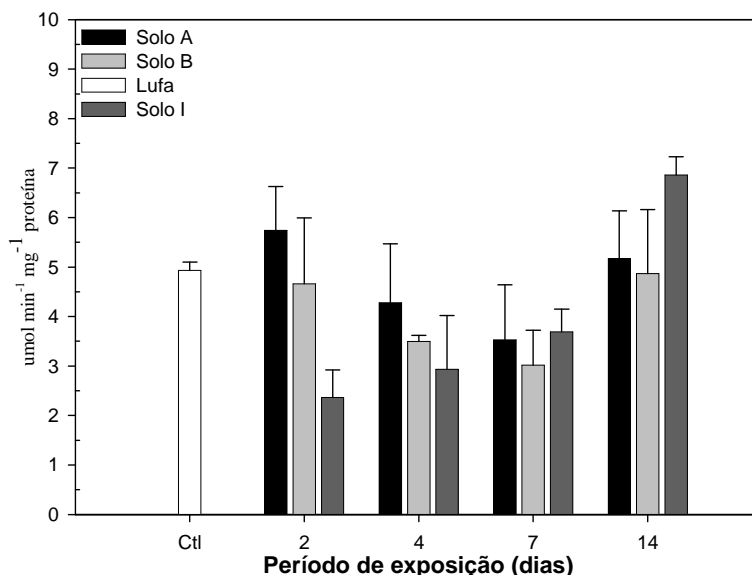


Figura 6 – Variação da actividade da enzima catalase (média \pm erro padrão) determinada em *E.andrei* exposta *in situ* aos solos A, B e I, para os diferentes períodos de exposição.

Os valores médios da actividade das enzimas GSTs estão representados na Figura 7. Estes apresentaram diferenças significativas apenas em relação ao tempo de exposição (ANOVA bifactorial: $F_{(4,30)} = 12,495$; $p < 0,001$), tal como a catalase. Os valores medidos para a actividade das GSTs dependeram assim apenas do tempo de exposição a que os organismos foram sujeitos. Verificou-se que os três solos escolhidos apresentam um padrão irregular de alteração dos valores de actividade das GSTs até ao dia 7. Apenas o solo A apresenta um valor ligeiramente mais elevado logo após dois dias de exposição, que desce a partir deste dia e acompanha os mesmos valores para os outros solos até ao dia 7. Do 7º ao 14º dia observa-se um aumento aparentemente pronunciado, já que se destacam dos valores obtidos até ao dia 7, sendo no entanto o solo I o único que apresenta diferenças significativas em relação ao solo Lufa 2.2, para este período de exposição (resultados do teste Dunnett) (Figura 7).

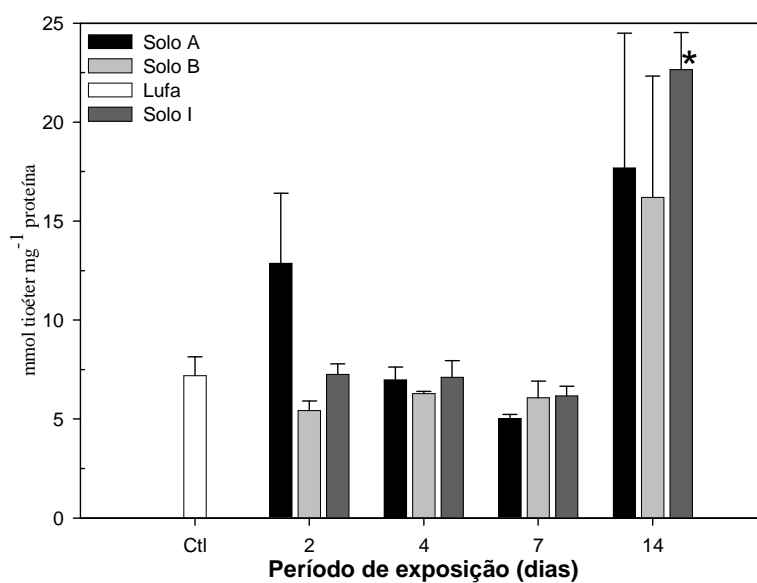


Figura 7 – Variação da actividade da enzima Glutathione S-transferase (média \pm erro padrão) determinada em *E. andrei* exposta *in situ* aos solos A, B e I, para os diferentes períodos de exposição. (*significativamente diferente do solo Lufa 2.2, com $p < 0.05$).

4. Discussão

4.1 Ensaio *in situ* e caracterização físico-química dos solos

O desenvolvimento de ensaios *in situ* não recebeu ainda grande atenção por parte dos ecotoxicologistas terrestres, preocupados em desenvolver e padronizar ensaios laboratoriais com diferentes espécies, representativas da diversidade taxonómica do compartimento. Deste modo, os dados sobre respostas *in situ*, para o compartimento terrestre, são escassos e insuficientes, pelo que este estudo realça-se pelo elevado interesse na validação de uma metodologia já desenvolvida pela nossa equipa, para um ensaio sub-letal *in situ* com *Eisenia andrei* (Antunes et al., *in press*) e contribui com informação científica válida relativa à bioacumulação de metais e a respostas de stress oxidativo. Os ensaios de evitamento com minhocas (48 hr, ISO 2005) têm sido largamente usados como uma ferramenta rápida de avaliação ecotoxicológica, já que estes organismos têm a capacidade de evitar solos contaminados (Cortet et al., 1999; Lukkari et al., 2005). Os ensaios de evitamento realizados por Antunes et al. (2008), com solos provenientes de uma mina de urânio abandonada, demonstraram que os organismos utilizados (*Eisenia andrei*) conseguiram fornecer uma indicação clara da toxicidade dos solos da zona, ainda que a mesma apenas possa ser considerada para uma fase de rastreio, requerendo uma avaliação mais profunda, com outras espécies e com avaliação de outros parâmetros sub-letais. Uma vez que o tempo de exposição definido para os ensaios de evitamento (48 horas) haviam resultado em respostas significativas dos organismos, Antunes et al. (*in press*), considerou igualmente este tempo de exposição, para o ensaio *in situ*, pelo facto de períodos mais prolongados não serem muito adequadas a este tipo de avaliações, não só porque encarecem a metodologia mas também porque aumentam em demasia o tempo necessário para dar uma avaliação dos riscos para a área contaminada em questão. Tal ensaio pretendia avaliar alterações biomoleculares (biomarcadores) nos organismos expostos *in situ*. O tempo de exposição considerado pareceu igualmente válido pelo facto de se esperar que as alterações a nível molecular se manifestem ao fim de algumas horas (Winston et al., 2002). No entanto, os resultados obtidos neste estudo revelaram alterações mínimas e/ou não significativas nos biomarcadores analisados. Tal resultado demonstrou a necessidade de prolongar o período de exposição do ensaio, de modo a verificar qual o tempo mínimo

necessário para se obterem respostas significativas, nos diferentes parâmetros avaliados, de forma que as mesmas permitissem distinguir solos com diferentes níveis de contaminação. O procedimento do ensaio foi seguido de acordo com o descrito no estudo previamente realizado, já que demonstrou ser de fácil execução e com capacidade de recuperação total dos organismos teste. A recuperação dos organismos vivos foi novamente de 100% e o procedimento decorreu conforme a descrição, sem qualquer dificuldade. A escolha dos solos utilizados no ensaio baseou-se em estudos anteriores, que demonstraram que dois deles (A e B) apresentavam concentrações elevadas de uma mistura complexa de metais, e elevada toxicidade sub-letal, em oposição ao solo I (escolhido como potencial solo de referência). Estes solos possuíam ainda propriedades físico-químicas diferentes em relação por exemplo ao pH e matéria orgânica (Antunes et al., 2008; Pereira et al., 2008). Este último facto foi, uma vez mais, constatado no presente estudo, com base nas diferenças significativas observadas entre solos pela análise de variância multivariada (MANOVA) que integrou os diferentes parâmetros físico-químicos e os conteúdos dos diferentes metais, extraídos com aqua regia. A escolha de solos naturais com diferentes níveis de contaminação permitia-nos esperar respostas diferentes dos parâmetros avaliados. Assim, com os resultados obtidos podemos dizer que o Solo A e o Solo B foram escolhidos como solos contaminados e o Solo I como um potencial solo de referência. O solo natural alemão, Lufa 2.2, continua a ser utilizado em ecotoxicologia, como um solo de referência, e no caso do presente estudo permitia-nos validar as boas condições fisiológicas dos organismos e os níveis base de metais bioacumulados.

O local A localiza-se sob o poço de exploração subterrânea, onde um efluente ácido continua a ser produzido, surgindo à superfície em resposta a subidas do nível do aquífero, continuando a afectar as zonas circundantes. Consequentemente, este solo apresentou os valores mais baixos de pH e de conteúdo em matéria orgânica entre os solos testados, condições descritas como potenciadoras de aumento da biodisponibilidade da maioria dos elementos metálicos (Fernández et al., 2005; Lukkari et al., 2004). No entanto, ao analisar a Tabela 2, verificamos que a concentração de metais no solo proveniente do local A é baixa, excepto para o Al e o Fe, o que indica a reduzida biodisponibilidade de metais neste local. No local B, adjacente ao local A, ocorre deposição de lamas provenientes da lagoa de tratamento, que são consideradas potencialmente perigosas devido ao alto teor em metais e rádio (Pereira et al., 2008; Santos Oliveira e Ávila, 1998). O tratamento químico

do efluente é feito com cloreto de bário (BaCl_2) que precipita os metais e os radionuclídeos e com carbonato de cálcio que eleva os níveis de pH de ≈ 3 para valores próximos da neutralidade (Santos Oliveira e Ávila, 2001). Estas lamas são depositadas no local B, o que justifica os valores de pH registados no solo do local B. O conteúdo em matéria orgânica no local B é elevado, apresentando os níveis maiores de entre os 3 locais do estudo, mas combinado com os níveis de pH quase-neutros, as condições tornam-se propícias à biodisponibilização de urânio (Vandenhove et al., 2007). Na Tabela 2 é possível observar que as concentrações de U no solo B foram mais elevadas comparativamente aos outros solos testados. O solo B apresentou ainda os valores mais elevados para a maioria dos metais analisados. O local I caracterizou-se por apresentar valores de pH perto da neutralidade e também com valores baixos de matéria orgânica. Como dito anteriormente, valores elevados de pH e o elevado conteúdo em matéria orgânica tendem a diminuir a biodisponibilidade de metais. No entanto, é necessário ressaltar que este local sofreu recentemente devastação da flora. Esta alteração da cobertura vegetal pode provocar um aumento da biodisponibilidade de alguns metais, nomeadamente o U, já que este é um dos radioelemento cuja mobilidade nos solos pode variar fortemente dependendo do tipo de solos e das propriedades físico-químicas (Echevarria et al., 2001). Por outro lado, e como já descrito por outros autores uma camada de vegetação poderá minimizar o impacto da radiação (Antunes, 2007). O solo Lufa 2.2 caracteriza-se de maneira similar, por apresentar teores baixos de metais (excepção para o Al, Fe). Surpreendentemente o urânio apresentou-se neste solo (Lufa 2.2) com a concentração mais elevada de todos os solos analisados. Pelo que a utilização deste solo como solo de referência parece estar um pouco comprometida sendo futuramente preferível que novos passos efectuados no sentido de validar este ensaio, considerem a utilização do solo artificial proposto pela OECD (1984).

4.2 Bioacumulação de metais

Em Antunes et al. (in press) os valores de bioacumulação foram o parâmetro que revelou maior sensibilidade e o único que permitiu fazer algumas inferências. O aumento do período de exposição para 14 dias neste ensaio pretendeu prolongar a exposição de modo a haver valores de bioacumulação mais significativos ou ainda, para se atingir um estado de equilíbrio entre as concentrações de metais no solo e nos organismos teste. De acordo com o conteúdo em metais obtido nos solos testados verificou-se que o solo B

apresentou uma maior biodisponibilidade de metais, na medida em que registaram níveis superiores de metais acumulados. Contrariamente ao esperado, o solo A apresentou as concentrações mais baixas de metais, apesar de estar localizado sobre a zona de lavra subterrânea, o que levaria a supor que fosse um dos mais contaminados. Um facto confirmado por Pereira et al. (2008), que de facto apresentava este solo como um dos mais perigosos devido ao facto de apresentar níveis de urânio e alumínio, extraídos com água da chuva artificial, acima de critérios de qualidade de solos. Tal situação indica-nos que as lamas provenientes da lagoa de tratamento do efluente ácido estão a ser a principal fonte de dispersão de contaminantes na zona.

Apesar da extensa caracterização físico-química do solo e da determinação do conteúdo em metais, a análise da toxicidade em sistemas acidificados, tais como as áreas mineiras, é dificultada pelos efeitos que a acidificação destes sistemas tem na especiação, mobilidade e biodisponibilidade de contaminantes do solo (Lopes et al., 1999). Nomeadamente, porque estes locais combinam concentrações elevadas de metais pesados e pH baixos, que aumentam a sua biodisponibilidade. A biodisponibilidade dos metais e a sua absorção pelos organismos teste (*E. andrei*) é complexa e determinada não só pela concentração total no solo mas também em função das características físico-químicas do solo, a cinética da bioacumulação, armazenamento e excreção, e a tolerância do organismo ao elemento (Arnold et al., 2003; Cortet et al., 1999). Assim, como os contaminantes metálicos raramente estão 100% biodisponíveis, o recurso a medidas biológicas directas de biodisponibilidade (determinação de bioacumulação) é útil, já que integra todos os factores que afectam a biodisponibilidade, bióticos (metabolismo) e abióticos (pH, conteúdo em matéria orgânica, concentração de iões competitivos) (Arnold et al., 2003; Lanno et al., 2004).

Os elementos metálicos que apresentaram concentrações mais elevadas, tanto no solo como em *E. andrei*, foram o Al e o Fe, em todos os solos seleccionados. Estes metais estão, entre outros, presentes em grandes quantidades na crosta terrestre, assim como por exemplo o Mn e o Cr (Caussy et al., 2003). Como se pode ver na Tabela 4, os valores de FBCs para estes dois elementos são próximos de 1, para os solos A e I, revelando que estes elementos que estão presentes em grandes concentrações nos solos, estão igualmente a ser bioacumulados em concentrações elevadas, muito possivelmente devida à ineficácia do sistema de excreção da espécie para os eliminar. Por oposição, no solo B, os valores de

FBCs para o Al e o Fe, são próximos de zero, o que sugere uma menor acumulação destes elementos. Tal facto poderá ser devido a uma complexação em formas iónicas, ou a adsorção à matéria orgânica que poderá estar a reduzir a sua disponibilização. Por outro lado registaram-se valores altos de FBCs para o Ba, o Cd, o Sr, o U e o Zn, o que indica que estes metais estão biodisponíveis para os organismos-teste, capazes de os acumular e bioconcentrar no organismo, apesar de as suas concentrações no solo nem sempre serem elevadas. Como se pode verificar na Tabela 5, esta bioacumulação é significativa para os 5 elementos referidos, comparativamente aos valores de Lufa 2.2 (teste Dunnett), sendo o U o único elemento em que esta ocorre em todos os solos. Nos outros elementos referidos, ocorre acumulação significativa de Cd e o Sr nos organismos teste expostos aos solos A e I; de Ba para os organismos teste expostos aos solos A e B e finalmente o Zn apenas se acumula nos organismos expostos ao solo A. Toda esta bioacumulação ocorre ao longo da exposição, sendo o Cd o elemento que mais acumula de entre os quatro (Tabela 4). O Cd é no entanto um dos elementos metálicos não-essenciais e a regulação provavelmente é pouca ou ausente (Heikens et al., 2001), acumulando-se assim durante muito tempo no organismo, já que a cinética deste elemento é lenta (Peijnenburg et al., 1999). Este facto é confirmado pelos valores obtidos de FBCs, onde a bioacumulação aumenta ao longo do tempo, de 111,2 a 171,7, para a exposição ao solo A.

O solo A apresentou os valores de FBCs mais elevados para 4 elementos, o Cd, o Sr, o U e o Zn, revelando-se significativamente diferentes dos valores dos solos B e I (teste Tukey), o que sugere que ao contrário do que havia sido concluído com base na caracterização físico-química, efectuada neste estudo, este solo poderá ser de facto um solo perigoso na medida em que apresenta metais de elevada toxicidade biodisponíveis para serem acumulados por organismos terrestres (Tabela 4). Isto está de acordo com os estudos efectuados por Pereira et al. (2008) e por Antunes et al. (2008). O Mn e o Ni foram também metais acumulados pelos organismos expostos a este solo. Contudo, enquanto que se verificou que os FBC de Cd e Ni aumentaram continuamente ao longo do tempo de exposição, os de urânio oscilaram, os de Mn e Zn mantiveram-se mais ou menos constantes, enquanto que os de Sr chegaram mesmo a diminuir. Isto demonstra que os organismos lidam de forma diferenciada com o urânio, sendo inclusivamente capazes de excretar alguns de forma mais eficaz, enquanto que outros apenas o fazem a partir do momento que os locais de aprisionamento dos metais estão saturados. A título de exemplo,

e em consonância com os nossos resultados, Lukkari et al. (2005), demonstrou que *E. andrei* regula a concentração de Zn internamente a um nível constante, qualquer que seja a concentração do solo a que estão expostas.

No solo B, as concentrações de Cd são as mais elevadas, no entanto os FBCs calculados foram muito baixos (inferiores a 1), o que sugere que este elemento não está biodisponível neste solo. De facto, nos organismos expostos a este solo, apenas os FBCs referentes ao Ba apresentaram valores elevados. Assim, apesar de a concentração de Ba no solo ser baixa, na ordem dos $8,50 \mu\text{g g}^{-1}$ de solo, a concentração de Ba em *E. andrei* é elevada, com máximo de $\approx 1000 \mu\text{g g}^{-1}$ peso seco de *E. andrei*. Este elemento resulta das lamas depositadas neste local provenientes da lagoa de tratamento, o qual parece estar biodisponível para os organismos terrestres. À semelhança do Cd, este parece ser mais um elemento com o qual os organismos não sabem lidar em virtude do facto de os FBCs aumentarem de forma contínua com o tempo de exposição.

No local I, obtiveram-se valores elevados de FBCs para 2 elementos, o Cd e o U. Os valores de FBC referentes ao Cd apresentam valores elevados, embora mais baixos do que na exposição ao solo A. O U apresentou valores preocupantes de FBCs (≈ 20). Estes valores vêm contrariar os resultados obtidos anteriormente por Antunes et al. (2008) e Pereira et al. (2008) que não registaram toxicidade para este local. Estes resultados poderão ser explicados, em parte, pelo facto de a camada de solo superficial ser sido remexida nesta zona (ver acima), posteriormente aos estudos destes autores, o que poderá ter contribuído para a biodisponibilização de alguns elementos metálicos.

Assim, segundo a análise estatística, quando comparados com o solo Lufa 2.2 (teste Dunnett), os FBCs de metais que demonstram diferenças significativas fazem-no a partir de vários períodos de exposição, variando com o solo a que foram expostos. Alguns metais, nomeadamente o Ba e o U na exposição ao solo B, apresentam FBCs significativamente diferentes do solo Lufa 2.2 apenas depois dos 14 dias de exposição e, outros metais nem sequer apresentam diferenças significativas do solo Lufa 2.2 em nenhum período de exposição, para os vários solos a que foram expostos. Por este motivo, podemos concluir que, de maneira a obter uma resposta significativa no parâmetro bioacumulação, ainda que não para todos os metais segundo o nosso ensaio, o período de exposição mínimo necessário é de 14 dias de exposição.

4.3 Biomarcadores de stress oxidativo

A maioria dos estudos com oligoquetas (nomeadamente *E. andrei*) é referente a exposições de curta duração (14 ou 21 dias), levadas a cabo em solos artificiais ou solos artificialmente contaminados (Nahmani et al., 2007). Os solos provenientes de áreas mineiras, como é o caso do presente estudo, são solos contaminados com uma mistura complexa de metais e com variações significativas das propriedades do solo (Antunes et al., 2007; O'Halloran, 2006), o que dificulta a interpretação dos resultados numa análise de risco. Assim, a maneira mais integrativa de avaliar o risco ecológico é combinar análise química e biológica (Weeks e Comber, 2005; Hankard et al., 2005). No presente estudo, a análise biológica foi determinada pela alteração de biomarcadores de stress oxidativo.

A resposta dos biomarcadores num ensaio *in situ* integra todos os factores específicos do local que influenciam a biodisponibilidade dos contaminantes, assim como dos efeitos de misturas de contaminantes e a heterogeneidade espacial/temporal da distribuição da contaminação no solo (Arnaud et al., 2000; Bundy et al., 2007). Deste modo, uma bateria de biomarcadores é claramente mais relevante que a determinação de apenas um biomarcador ou outro parâmetro. Assim, este estudo apresenta também a alteração da actividade de 3 biomarcadores de stress oxidativo, nomeadamente um biomarcador indicador de peroxidação lipídica (TBARS) e a actividade de duas enzimas, nomeadamente: a Catalase (CAT), e as Glutathione-S-Transferases (GST).

Os sistemas biológicos têm desenvolvido durante a sua evolução mecanismos antioxidantes enzimáticos ou não enzimáticos adequados para proteger os componentes celulares de danos oxidativos. O balanço entre a geração e a neutralização de ROS por mecanismos antioxidantes num organismo é chamado stress oxidativo (Valavanidis et al., 2006). A actividade destes mecanismos antioxidantes tem um importante papel em manter a homeostasia da célula, podendo ser induzida ou inibida depois da exposição a contaminantes (Doyotte et al., 1997; Cossu et al., 1997). Uma indução pode ser considerada uma adaptação, permitindo ao sistema biológico superar parcialmente ou totalmente o stress resultante de uma exposição a um ambiente inseguro. Em contraste, uma deficiência no sistema antioxidante vai induzir um estado precário, tornando as espécies biológicas mais susceptíveis aos agentes tóxicos e iniciando e potenciando os efeitos tóxicos. De facto, tal deficiência vai prejudicar a habilidade de neutralizar as espécies reactivas, como as ROS, produzidas pelos processos metabólicos normais, e de

prevenir danos celulares (Doyotte et al., 1997; Cossu et al., 1997); neste caso a acção dos tóxicos é feita de forma indirecta.

A resposta adaptativa inclui algumas enzimas como por exemplo a catalase, que incluímos no nosso ensaio, e que é envolvida no sistema de defesa da célula através da eliminação de H_2O_2 , um produto do metabolismo celular, o qual é extremamente perigoso pelo seu poder oxidante (Elia et al., 2007). No presente estudo verificamos que na resposta dos organismos à exposição aos solos naturais da área da mina da Cunha Baixa, os valores de Catalase diminuem do início do ensaio até ao 7º dia, a partir do qual se observou um aparente aumento (Figura 6). Segundo as afirmações referidas anteriormente, podemos concluir que nos primeiros 7 dias de exposição estes mecanismos antioxidantes foram inibidos, apresentando uma ligeira recuperação a partir deste período. Verificamos no entanto valores mais elevadas de actividade desta enzima nos organismos expostos ao solo A, demonstrando que este solo poderá ter induzido a actividade destas enzimas. Contudo, de acordo com a análise, tratam-se apenas de diferenças aparentes na medida em que não se registou um efeito significativo do factor solo neste parâmetro. Demonstrou sim diferenças significativas em relação ao tempo de exposição, no entanto o teste de Dunnett não foi capaz de discernir para que tempos de exposição a actividade da enzima catalase foi significativamente diferente da registada no solo Lufa 2.2. Estes resultados não permitiram assim definir um período de exposição *in situ* óptimo para avaliar este biomarcador em *E. andrei*. Além da catalase, também as peroxidases são responsáveis pela destoxificação de H_2O_2 da célula. Segundo Fatima e Ahmad (2005), o facto de a catalase não demonstrar actividade significativa pode ser devido à actividade de outra enzima envolvida na destoxificação de H_2O_2 da célula, como por exemplo as peroxidases, que estando activas competem com a actividade da catalase, tornando-a menos activa.

Quando as defesas antioxidantes são equiparadas ou superadas, o stress oxidativo pode produzir danos no ADN, inactivação de enzimas e peroxidação dos constituintes da célula, especialmente peroxidação lipídica (Doyotte et al., 1997). Assim, como já descrito anteriormente, a diminuição dos mecanismos antioxidantes, nomeadamente a Catalase, torna a célula mais susceptível a agentes tóxicos, tornando-se evidente no presente estudo. Assim como foi referido, os valores de Catalase diminuem nos primeiros 7 dias de exposição nos organismos expostos aos solos A e B, verificando-se um aumento da extensão da peroxidação lipídica neste período, situação observada em vários estudos em

que as concentrações mais elevadas de malonildialdeído (MDA) aconteceram em paralelo com a menor actividade dos sistemas antioxidantes (Cossu et al., 1997; Doyotte et al., 1997), verificando-se no entanto que este aumento acontece até ao final do ensaio. Este aumento verifica-se na exposição aos três solos, sendo os valores referentes ao solo I maiores na maior parte do ensaio. Segundo a análise estatística realizada (One-Way ANOVA) verificou-se que os valores de TBARS quando comparados com o solo Lufa 2.2, apresentam diferenças significativas para o solo A apenas no dia 2 e no dia 7 enquanto que para o solo B, os valores de TBARS apresentam diferenças significativas apenas para o dia 7 e o dia 14. Segundo a ANOVA bifactorial, os valores de TBARS determinados revelaram ser significativamente diferentes em relação ao solo, ao tempo de exposição e à interacção entre estes dois factores. Através dos resultados estatísticos obtidos com este biomarcador (teste Tukey após ANOVA bifactorial), pode-se afirmar que os solos A e B são significativamente diferentes do solo I. É no entanto o solo I que apresenta os valores de TBARS mais elevados relativamente aos valores referentes aos solos A e B. Estes valores mais elevados de peroxidação lipídica podem ser devidos à toxicidade induzida pelos elevados níveis de FBCs de Cd e U encontrados neste solo, provocando danos nas células e aumentando os valores de TBARS. Assim, para este biomarcador pode concluir-se que o período de exposição mínimo para se obterem respostas sensíveis será um ensaio de 7 dias, no entanto 14 dias será o período de exposição ideal.

As glutionas S-transferases são enzimas da fase II do metabolismo de xenobióticos, que se conjugam com os compostos não degradados na fase I, destoxificando-os por meio de inactivação e excreção (Schreck et al., 2008). O aumento na actividade das enzimas GST sugere que o processo de destoxificação foi induzido (Elia et al., 2007). Contudo, parece não existir uma relação directa com o nível de contaminação dos solos, na medida em que não se registou um efeito significativo do factor solo neste parâmetro. Quanto ao tempo de exposição, foram verificadas diferenças significativas ainda que estas só ocorram no solo I, ao 14º dia, quando comparadas com o solo Lufa 2.2. Os valores de GST mantêm-se assim numa gama constante de valores durante os primeiros períodos de exposição, sendo apenas no último período de exposição, de 14 dias, que os valores de GST aumentam aparentemente para os três solos, já que apenas um (o solo I) revela diferenças significativas do solo Lufa 2.2 neste período de exposição. Segundo os

resultados obtidos para os organismos expostos ao solo I o ensaio para ser sensível a este biomarcador deveria decorrer durante pelo menos 14 dias.

Assim, podemos dizer que os parâmetros de sistemas antioxidantes podem ser biomarcadores úteis reflectindo não só a exposição aos contaminantes mas também toxicidade. Os biomarcadores que conseguem medir exposição e providenciar uma boa indicação de toxicidade podem ser muito úteis em avaliar o impacto ambiental de contaminantes no campo (Cossu et al., 1997). Em suma, com os resultados obtidos verificou-se que, para que se pudesse obter respostas sensíveis aos biomarcadores determinados neste ensaio, o período de exposição mínimo seria de 14 dias. Os TBARS revelaram sensibilidade significativa após o 2º, 7º e 14º dia, os valores de GST registados só aos 14 dias revelaram diferenças e a Catalase demonstrou não ser sensível nem em relação ao tempo de exposição, nem em relação ao solo.

5. Conclusão

Ao fim de 48 horas de exposição obteve-se os primeiros dados do ensaio, tal como Antunes et al. (*in press*). No ensaio anterior, verificou-se que a bateria de biomarcadores utilizados não demonstrou ser sensível à exposição aos solos contaminados após exposição de 48 horas e apenas a bioacumulação foi um parâmetro discriminatório. No presente trabalho os resultados não foram muito diferentes. Mais uma vez, os biomarcadores apresentaram-se como um parâmetro pouco sensível, no entanto ao longo dos períodos de exposição foi possível distinguir um período sensível para distinção entre a contaminação dos solos usados para dois dos biomarcadores estudados, nomeadamente para a extensão de peroxidação lipídica (TBARS) e para a actividade das enzimas glutathione S-transferases (GST). Assim, para os TBARS obtemos uma alteração significativa após 2, 7 e 14 dias de exposição, enquanto que a GST só revelou alterações significativas após o 14º dia de exposição, concluindo-se que para o ensaio revelar sensibilidade para os biomarcadores estudados o período de exposição mínimo deverá ser de 14 dias. Estes períodos foram no entanto resultados da exposição a um (solo I para a GST) e dois (Solos A e B para os TBARS) dos solos estudados, e não para a totalidade dos solos estudados. Quanto à actividade da enzima Catalase, nenhuma alteração significativa foi observada, pelo que o período de exposição de 14 dias pode não ter sido suficiente para este biomarcador.

Na análise da bioacumulação o período de exposição de 14 dias parece ser também o mais adequado para obter alterações significativas. Alguns metais apresentam bioacumulação significativa logo após o 2º dia de exposição, nomeadamente o Ba, Ni, Sr, U e Zn na exposição ao solo A; o Al, Be e Pb na exposição ao solo B e; o Be, Cd, Fe e U na exposição ao solo I. No entanto, os restantes metais não referidos anteriormente nos diferentes solos ou não apresentam quaisquer alterações significativas ou apenas o fazem depois de 4, 7 ou mesmo 14 dias de exposição, pelo que o período mínimo necessário para obter respostas sensíveis neste parâmetro é, de facto, 14 dias assim como para os biomarcadores. Pelos resultados obtidos com os dois parâmetros analisados (bioacumulação e biomarcadores) podemos concluir que para distinguirmos os solos com diferentes níveis de contaminação, o período de exposição também não deve ser inferior aos 14 dias.

O presente estudo permitiu-nos verificar que realmente, para obter respostas significativas, o ensaio *in situ* deve ter um período de exposição mais extenso que o utilizado inicialmente por Antunes et al. *in press*. As diferenças significativas obtidas nos biomarcadores são provavelmente devido ao conteúdo metálico presente nos locais estudados que, segundo as propriedades físico-químicas de cada local, disponibilizam mais ou menos metais. Também nos FBCs se verifica a influência das propriedades físico-químicas do solo a que foram sujeitos, já que a acumulação do mesmo elemento se comporta de maneira diferente segundo o solo a que foi exposto.

6. Bibliografia

- Adams, S.M., Giesy, J.P., Tremblay, L.A., Eason, C.T. (2001). The use of biomarkers in ecological risk assessment: recommendations from the Christchurch conference on Biomarkers in Ecotoxicology. *Biomarkers* **6**(1), 1-6
- Aebi, H. (1984). Catalase in vitro. *Methods in Enzymology*. **105**, 121-126
- Alla, A.A., Mouneyrac, C., Durou, C., Moukrim, A., Pellerin, J. (2006). Tolerance and biomarkers as useful tools for assessing environmental quality in the Oued Souss estuary (Bay of Agadir, Morocco). *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C* **143**, 23-29
- Antunes, S.C., Figueiredo, D.R., Marques, S.M., Castro, B.B., Pereira, R., Gonçalves, F. (2007). Evaluation of water column and sediment toxicity from an abandoned uranium mine using a battery of bioassays. *Science of the Total Environment* **374**, 252-259
- Antunes, S.C.F.M. (2007). Avaliação ecotoxicológica integrada da área adjacente a uma mina de urânio abandonada. Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Doutor em Biologia. Departamento de Biologia, Universidade de Aveiro, 137 Pp., policopiado.
- Antunes, S.C., Castro, B.B., Pereira, R., Gonçalves, F. (2008). Contribution for tier 1 of the ecological risk assessment of Cunha Baixa uranium mine (Central Portugal): II. Soil ecotoxicological screening. *Science of the Total Environment* **390**: 387-395
- Antunes, S.C., Castro, B.B., Nunes, B., Pereira, R., Gonçalves, F. (in press). *In situ* bioassay with *Eisenia andrei* to assess soil toxicity in an abandoned uranium mine. *Ecotoxicology and Environmental Safety*
- Arnaud, C., Saint-Denis, M., Narbonne, J.F., Soler, P., Ribera, D. (2000). Influences of different standardised test methods on biochemical responses in the earthworm *Eisenia fetida andrei*. *Soil Biology & Biochemistry* **32**, 67-73
- Arnold, R.E., Hodson, M.E., Black, S., Davies, N.A. (2003). The influence of mineral solubility and soil solution concentration on the toxicity of copper to *Eisenia fetida* Savigny. *Pedobiologia* **47**, 622-632
- APHA-AWWA-WEF. (1995). Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater. 19th Edition, American Public Health Association, Washington DC.

- Beck, L., Römbke, J., Breure, A.M., Mulder, C. (2005). Considerations for the use of soil ecological classification and assessment concepts in soil protection. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **62**, 189-200
- Bolognesi, C., Frenzilli, G., Lasagna, C., Perrone, E., Roggieri, P. (2004). Genotoxicity biomarkers in *Mytilus galloprovincialis*: wild versus caged mussels. *Mutation Research* **552**, 153-162
- Box, A., Sureda, A., Galgani, F., Pons, A., Deudero, S. (2007). Assessment of environmental pollution at Balearic Islands applying oxidative stress biomarkers in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Comparative Biochemistry and Physiology* **146**, 531-539
- Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-254
- Buege, J.A., Aust, S.D. (1978). Microsomal lipid peroxidation. *Methods in Enzymology* **52**, 302-310
- Burton Jr, G.A., Greenberg, M.S., Rowland, C.D., Irvine, C.A., Lavoie, D.R., Brooker, J.A., Moore, L., Raymer, D.F.N., McWilliam, R.A. (2005). In situ exposures using caged organisms: a multi-compartment approach to detect aquatic toxicity and bioaccumulation. *Environmental Pollution* **134**, 133-144
- Bundy, J.G., Keun, H.C., Sidhu, J.K., Spurgeon, D.J., Svendsen, C., Kille, P., Morgan, A.J. (2007). Metabolic Profile Biomarkers of Metal Contamination in a Sentinel Terrestrial Species are applicable across multiple sites. *Environ. Sci. Technol* **41**, 4458-4464
- Callahan, C.A., Menzie, C.A., Burmaster, D.E., Wilborn, D.C., Ernst, T. (1991). On-site methods for assessing chemical impact on the soil environment using earthworms: a case study at the baird and McGuire superfund site, Holbrook, Massachusetts. *Environmental Toxicology and Chemistry* **10**, 817-826
- Castro, B.B., Guilhermino, L., Ribeiro, R. (2003). In situ bioassay chambers and procedures for assessment of sediment toxicity with *Chironomus riparius*. *Environmental Pollution* **125**, 325-335
- Castro, B.B., Sobral, O., Guilhermino, L., Ribeiro, R. (2004). An *In Situ* Bioassay integrating individual and biochemical responses using small fish species. *Ecotoxicology* **13**, 667-681

- Caussy, D., Gochfeld, M., Gurzau, E., Neagu, C., Ruedel, H. (2003). Lessons from case studies of metals: investigating exposure, bioavailability, and risk. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **56**, 45-51
- Cortet, J., Vauflery, A.G., Poinot-Balaguer, N., Gomot, L., Texier, C., Cluzeau, D. (1999). The use of invertebrate soil fauna in monitoring pollutant effects. *European Journal of Soil Biology* **35**, 115-134
- Cossu, C., Doyotte, A., Jacquin, M.C., Babut, M., Exinger, A., Vasseur, P. (1997). Glutathione Reductase, Selenium-Dependent Glutathione Peroxidase, Glutathione Levels, and Lipid Peroxidation in Freshwater Bivalves, *Unio tumidus*, as Biomarkers of Aquatic Contamination in Field Studies. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **38**, 122-131
- De Coen, W., Robbens, J., Janssen, C. (2006). Ecological impact assessment of metallurgic effluents using *in situ* biomarker assays. *Environmental Pollution* **141**, 283-294
- Doyotte, A., Cossu, C., Jacquin, M-C., Babut, M., Vasseur, P. (1997). Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimental or field exposure in the gills and the digestive gland of the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Aquatic Toxicology* **39**, 93-110
- Echevarria, G., Sheppard, M.I., Morel, J.L. (2001). Effect of pH on the sorption of uranium in soils. *Journal of Environmental Radioactivity* **53**, 257-264
- Elia, A.C., Galarini, R., Dörr, A.J.M., Taticchi, M.I. (2007). Heavy metal contamination and antioxidant response of a freshwater bryozoan (*Lophopus crystallinus* Pall., Phylactolaemata). *Ecotoxicology and Environmental Safety* **66**, 188-194
- FAOUN. (1984). Food and Agriculture Organization of the United Nations, Physical and chemical methods of soil and water analysis. *Soils Bulletin* **10**, 1-275
- Faria, M.S., Ré, A., Malcato, J., Silva, P.C.L.D., Pestana, J., Agra, A.R., Nogueira, A.J.A., Soares, A.M.V.M. (2006). Biological and functional responses of *in situ* bioassays with *Chironomus riparius* larvae to assess river water quality and contamination. *Science of the Total Environment* **371**, 125-137
- Fatima, R.A., Ahmad, M. (2005). Certain antioxidant enzymes of *Allium cepa* as biomarkers for the detection of toxic heavy metals in wastewater. *Science of the Total Environment* **346**, 256-273
- Fent, K. (2004). Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology* **205**, 223-240

- Fernández, M.D., Cagigal, E., Veja, M.M., Urzelai, A., Babín, M., Pro, J., Tarazona, J.V. (2005). Ecological risk assessment of contaminated soils through direct toxicity assessment. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **62**, 174-184
- Fernández, M.D., Vega, M.M., Tarazona, J.V. (2006). Risk-based ecological soil quality criteria for the characterization of contaminated soils. Combination of chemical and biological tools. *Science of the Total Environment* **366**, 466-484
- Gupta, S.K., Vollmer, M.K., Krebs, R. (1996). The importance of mobile, mobilisable and pseudo total heavy metal fractions in soil for three-level risk assessment and risk management. *The Science of the Total Environment* **178**, 11-20
- Habig, W.H., Pabst, M.J., Jakoby, W.B. (1974). Glutathione S-Transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry* **249**, 7130-7139
- Hankard, P.K., Svendsen, C., Wright, J., Wienberg, C., Fishwick, S.K., Spurgeon, D.J., Weeks, J.M. (2004). Biological assessment of contaminated land using earthworm biomarkers in support of chemical analysis. *Science of the Total Environment* **330**, 9-20
- Hankard, P.K., Bundy, J.G., Spurgeon, D.J., Weeks, J.M., Wright, J., Weinberg, C., Svendsen, C. (2005). Establishing principal soil quality parameters influencing earthworms in urban soils using bioassays. *Environmental Pollution* **133**, 199-211
- Heikens, A., Peijnenburg, W.J.G.M., Hendricks, A.J. (2001). Bioaccumulation of heavy metals in terrestrial invertebrates. *Environmental Pollution* **113**, 385-393
- ISO (2005). Soil Quality: Avoidance Test for Testing the Quality of Soils and the Toxicity of Chemicals – Test with Earthworms (*Eisenia fetida*). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland
- Jensen, J., Mesman, M., Bierkens, J., Rutgers, M., 2006. Chapter I— principles and concepts in ecological risk assessment. In: Ecological Risk Assessment of Contaminated Land—Decision Support for Site Specific Investigations. ISBN 90-6960-138-9/978-90-6960-138-0. Pdf Document, p. 138.
- Lægdsmand, M., Villholth, K.G., Ullum, M., Jensen, K.H. (1999). Processes of colloid mobilization and transport in macroporous soil monoliths. *Geoderma* **93**: 33-59
- Lanno, R., Wells, J., Conder, J., Bradham, K., Basta, N. (2004). The bioavailability of chemicals in soil for earthworms. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **57**, 39-47

- Lopes, I., Gonçalves, F., Soares, A.M.V.M., Ribeiro, R. (1999). Discriminating the Ecotoxicity Due to Metals and to Low pH in Acid Mine Drainage. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **44**, 207-214
- Lukkari, T., Taavitsainen, M., Väisänen, A., Haimi, J. (2004). Effects of heavy metals on earthworms along contamination gradients in organic rich soils. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **59**, 340-348
- Lukkari, T., Aatsinki, M., Väisänen, A., Haimi, J. (2005). Toxicity of copper and zinc assessed with three different earthworm tests. *Applied Soil Ecology* **30**, 133-146
- Martín-Díaz, M.L. (2004): Biomarkers as tools to assess sediment quality. Laboratory and field surveys. *Trends in Analytical Chemistry* **23**, n°10-11
- Moreira, S.M., Lima, I., Ribeiro, R., Guilhermino, L. (2006). Effects of estuarine sediment contamination on feeding and on key physiological functions of the polychaete *Hediste diversicolor*: Laboratory and *in situ* assays. *Aquatic Toxicology* **78**, 186-201
- Nahmani, J., Hodson, M.E., Black, S. (2007). Effects of metals on life cycle parameters of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to field-contaminated, metal-polluted soils. *Environmental Pollution* **149**, 44-58
- OCDE - Organisation for Economic Co-operation and Development, 1984. Earthworms acute, toxicity tests. Guideline 207. Paris, France. 9 Pp.
- O'Halloran, K. (2006). Toxicological Considerations of Contaminants in the Terrestrial Environment for Ecological Risk Assessment. *Human and Ecological Risk Assessment* **12:1**, 74-83
- Oliveira, J.M.S., Ávila, P.F. (1998). Estudo Geoquímico na Área da Mina da Cunha Baixa (Mangualde, no centro de Portugal). Lisboa, Portugal: Instituto Geológico e Mineiro, 57 pp;
- Oliveira, J.M.S., Ávila, P.F. (2001). Geoquímica na área envolvente da mina da Cunha Baixa (Mangualde, no centro de Portugal). Estudos, Notas e Trabalhos. Tomo 43. Instituto Geológico e Mineiro
- Peijnenburg, W.J.G.M., Baerselman, R., Groot, A.C., Jager, T., Posthuma, L., Van Veen, R.P.M. (1999) Relating Environmental Availability to Bioavailability: Soil-Type-Dependent Metal Accumulation in the Oligochaete *Eisenia andrei*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **44**, 294-310

- Peijnenburg, W.J.G.M., Jager, T. (2003). Monitoring approaches to assess bioaccessibility and bioavailability of metals: Matrix issues. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **56**, 63-77
- Peijnenburg, W.J.G.M., Zablotskaja, M., Vijver, M. (2007). Monitoring metals in terrestrial environments within a bioavailability framework and a focus on soil extraction. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **67**, 163-179
- Pereira, A.M.M., Soares, A.M.V.M., Gonçalves, F., Ribeiro, R. (2000): "Water-Column, Sediment, and in Situ Chronic Bioassays with Cladocerans. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **47**, 27-38
- Pereira, R., Antunes, S.C., Marques, S.M., Gonçalves, F. (2008) Contribution for tier 1 of the ecological risk assessment of Cunha Baixa uranium mine (Central Portugal): I-Soil Chemical characterization. *Science of the Total Environment* **390**: 370-386
- Quinn G.P., Keough M.J. (2002). Experimental Design and Data Analysis for Biologists. Cambridge, U.K.:Cambridge University Press
- Schreck, E., Geret, F., Gontier, L., Treilhou, M. (2008). Neurotoxic effect and metabolic responses induced by a mixture of six pesticides on the earthworm *Aporrectodea caliginosa nocturna*. *Chemosphere* **71**, 1832-1839
- Semenzin, E., Critto, A., Rutgers, M., Marcomini, A. (2008). Integration of bioavailability, ecology and ecotoxicology by three lines of evidence into ecological risk indexes for contaminated soil assessment. *Science of the Total Environment* **389**, 71-86
- SPAC – Soil and Plant Analysis Council. (2000). Handbook of Reference Methods, CRC Press, Boca Raton
- Valavanidis, A., Vlahogianni, T., Dassenakis, M., Scoullos, M. (2006). Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **64**, 178-189
- Vandenhove, H., Hees, M.V., Wouters, K., Wannijn, J. (2007). Can we predict uranium bioavailability based on soil parameters? Part 1: Effect of soil parameters on soil solution uranium concentration. *Environmental Pollution* **145**, 587-595
- van Straalen, N.M. (2002). Assessment of soil contamination - a functional perspective. *Biodegradation* **13**, 41-52
- Vidal, M.L., Bassères, A., Narbonne, J.F. (2002). Influence of temperature, pH, oxygenation, water-type and substrate on biomarker responses in the freshwater clam

- Corbicula fluminea (Müller). *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* **132**, 93-104
- Weeks, J.M., Comber, S.D.W. (2005). Ecological risk assessment of contaminated soil. *Mineralogical Magazine* **69(5)**, 601-613
- Winston, G.W., Adams, S.M., Benson, W.H., Gray, L.E.Jr., Matthews, H.B., Moore, M.N., Safe, S.H. (2002). Biological bases of similarities and differences, in: Di Giulio, R.T., Benson, W.H., (Eds), *Inter Connections between human health and ecological integrity*. Setac Press, USA, pp 43-64
- Zar, J.H. (1999). *Biostatistical Analysis*. New Jersey, USA: Prentice-Hall International Inc